



300627  
5  
2ej

UNIVERSIDAD LA SALLE  
FACULTAD DE QUIMICA  
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

ESTUDIO DE ALGUNOS ASPECTOS  
BIOQUIMICOS DE LA FERMENTACION  
QUE PRODUCE POZOL

T E S I S  
que para obtener el título de  
Químico Farmacéutico Biólogo  
presenta

María Patricia Medina Mora Villagrán

1985

México, D. F.



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

JURADO	1
AGRADECIMIENTOS	2
I INTRODUCCION	3
II OBJETIVOS	13
III GENERALIDADES	14
3.1 FERMENTACIONES	14
3.1.1 DEFINICION Y TIPOS	14
3.1.2 FERMENTACIONES DE CEREALES Y ALMIDONES	17
3.1.3 FERMENTACIONES DE MAIZ	23
3.2 FIJACION DE NITROGENO	25
3.2.1 MICROORGANISMOS FIJADORES DE NITROGENO	30
3.2.2 CARACTERISTICAS DEL MICROORGANISMO EN ESTUDIO	32
3.3 EL POZOL	39
IV METODOS	44
4.1 PREPARACION DE MASA PARA LA FERMENTACION	44

4.2 PREPARACION DEL INOCULO	45
4.3 PREPARACION DE LAS MUESTRAS DE LA FERMENTACION	45
4.4 PREPARACION DE LAS MUESTRAS PARA SU ANALISIS	46
4.5 ANALISIS DE LAS MUESTRAS	47
4.5.1 ANALISIS DE VIA HUMEDA	47
4.5.2 ANALISIS DE MUESTRAS SECAS	47
V RESULTADOS	48
VI ANALISIS DE RESULTADOS	54
VII CONCLUSIONES	60
VIII RECOMENDACIONES	62
IX APENDICES	63
9.1 BIBLIOGRAFIA	63
9.2 ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA	77
9.2.1 INSTITUTCIONES	77
9.2.2 UNIDADES	77
9.2.3 QUIMICAS Y BIOQUIMICAS	78

JURADO DE LA TESIS

PRESIDENTE: M en C. María de Lourdes Escamilla H.

PRIMER VOCAL: Dra. Ruby Nickel de Castrejón

SECRETARIO: Q.F.B. Mariano LLera F.

1er. SUPLENTE : Ing. José Luis Curiel

2do. SUPLENTE: Ing. Alberto Romero M.

## AGRADECIMIENTOS Y RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se realizó gracias a la valiosa dirección y asesoría de la Dra. Ruby Nickel y del Dr. Hermilo Leal, a quienes les estoy profundamente agradecida. Asimismo hago extensivo mi agradecimiento al personal del departamento de Alimentos de la Unidad de Postgrado de la facultad de Química de la UNAM por las facilidades otorgadas para realizar el presente trabajo en sus instalaciones. También quiero hacer patente la colaboración de la QFB. Ma. Isabel Torreblanca, la QFB. Ana María Lacy y del Ing. Jorge García A. en algunos aspectos de este trabajo.

## I N T R O D U C C I O N

En la alimentación humana son necesarios los alimentos que aportan energía, así como aquellos que aportan vitaminas, minerales y proteínas. Los alimentos que nos proporcionan proteínas pueden ser de dos tipos: animales o vegetales. Los de tipo animal son mejores gracias a su contenido adecuado de aminoácidos. En cambio, los de tipo vegetal son deficientes en alguno o algunos de los aminoácidos básicos o esenciales, como son la metionina, la lisina y el triptofano. (19)

En el mundo cada vez se requieren más alimentos, por lo que actualmente se buscan nuevas fuentes de producción con una clara tendencia a obtener alimentos de mayor valor nutritivo a un menor costo. Dentro de esta tendencia, la obtención de alimentos proteínicos no se puede limitar a los de tipo animal, ya que en términos comparativos, son de un costo elevado y de bajo nivel de producción; por lo que resulta conveniente buscar cultivos que contengan el valor proteínico requerido, con un mayor rendimiento en su producción y cuyo costo sea comparativamente menor, de tal forma que sean accesibles a poblaciones de mas bajos recursos. (28)

Estudios realizados por diversas instituciones mundiales de salud, nos muestran que los países con mayores posibilidades

económicas basan su alimentación en una combinación de alimentos de origen animal y vegetal y que en algunos países, como es el caso de los Estados Unidos de Norte América, el consumo de proteínas llega a ser hasta de un 70% de origen animal. Por su parte, el consumo de proteínas en países en vías de desarrollo, además de ser de menor cantidad que la requerida, - es también de menor calidad ya que proviene en un 70% (y en algunos casos hasta en un 90% o más) de origen vegetal, lo cual crea una problemática en torno a la alimentación de estos pueblos. (28)

Las poblaciones en vías de desarrollo basan su alimentación - en el consumo de productos almidonosos como los cereales: sin embargo, se reconoce que a medida que aumentan sus niveles económicos y de información externa, se incrementa su demanda de alimentos de mejor calidad. De esta forma, dichos países se ven continuamente en la necesidad de buscar y desarrollar nuevas y cada vez más ricas y económicas fuentes alimenticias. Esta búsqueda se desarrolla por muy diversos caminos, tales - como: mejoras en la producción, incremento en la calidad y obtención de fuentes alternas, entre otros. Algunos ejemplos de lo anterior son los siguientes:

- a) En estudios realizados con la soya, se encontró que esta leguminosa, únicamente es deficiente en metionina, aminoácido que puede suplementársele, independientemente de que la soya se puede complementar con otros alimentos de bajo

costo como el frijol. La soya se consume en diversas formas: germinados, frijol o bien hidrolizados y texturizados de alto valor proteínico, con los cuales se enriquecen, o bien, se substituyen otros alimentos. (12, 83)

- b) Se realizan estudios que buscan la mejora genética de los cultivos, sobre todo de leguminosas y cereales como el arroz, el maíz, el trigo, ya sea para modificar su contenido de aminoácidos, mejorar su rendimiento por hectárea o ambos. En este caso se encuentran el opaque, que es el maíz que presenta mayor contenido de lisina y triptofano, y el triticale que es un híbrido de maíz y trigo. (19, 28 81)

- c) Entre las investigaciones que sobre las proteínas de origen microbiano se realizan, encontramos:

- La producción de biomasa celular para formar concentrados proteínicos.
- El enriquecimiento proteínico por medio de la fermentación, con algún microorganismo, de alimentos almidonosos como los plátanos y las papas, o bien de desperdicios de éstos, en el caso de alimentos para ganados.

(60, 61, 63, 79)

Ya que existe una gran escasez de alimentos en muy diversas regiones, se deben buscar soluciones adecuadas a cada una de ellas; como por ejemplo: a las poblaciones de bajos recursos

que habitan en zonas tropicales, el investigador T. J. Goering les sugiere fomentar el cultivo de tubérculos como la yuca y la batata, o los plátanos, cuyo rendimiento por hectárea es mucho mayor, además de que el desperdicio es menor que el de los cereales. En el caso específico de la yuca, es conveniente saber que además de consumirse fresca, puede utilizarse, gracias a la tecnología, como harina para pan, procesada para consumo humano, como materia prima en alimentos para ganado, como almidón y materia prima para la producción de alcohol. (11)

A pesar de lo anterior, el problema de estos cultivos es que su contenido proteínico es mucho menor que el de los cereales aun cuando tienen un alto contenido en calcio y vitamina A, -por lo que deben complementarse con leguminosas de semillas o leosas como el cacahuate. (25, 44, 52)

Desafortunadamente, la aplicación generalizada de estos descubrimientos y esfuerzos está aun muy distante, ya que es frecuente el distanciamiento físico, tecnológico, económico y de información entre quienes realizan los estudios y quienes deberían utilizarlos.

De esta forma, nos encontramos que los pueblos en vías de desarrollo -como México-, presentan una alimentación deficiente y por tanto, problemas de desnutrición, como se puede confir-

mar en los estudios dados a conocer por el Dr. Arturo Lomelí (\*1) en 1984 en los que se afirma que en nuestro país: "Ciento veinte mil niños desnutridos mueren cada año, y de los setenta millones que somos treinta y cinco millones sufren desnutrición de diferente grado y por tanto padecen debilidad, lesiones cerebrales irreversibles y deficiencias intelectuales". (42)

En efecto, nuestro país padece desnutrición, pero es importante establecer la diferencia entre el padecer hambre o desnutrición: el hambre es una falta aguda de alimentos; la desnutrición es una deficiencia crónica de éstos.

El hambre, cuando se presenta con toda su agresividad, puede provocar reacciones positivas que tiendan a remediarla, las cuales pueden ser desde reacciones de protesta pacífica, hasta reacciones violentas inclusive. Por su parte, el desnutrido es conformista, no siente la necesidad de comer más y mejor. Arrastra incapacidades e ineptias sin darse cuenta de ellas. La desnutrición es, de hecho, un proceso metabólico que se caracteriza por la falta de nutrimentos en los alimentos consumidos, y el organismo se altera como resultado de --

---

\*1 El Dr. Arturo Lomelí es representante, en nuestro país, de la Organización Internacional de Uniones de Consumidores.

esta insuficiencia, a pesar de que, como declara el Dr. Adolfo Chávez: " La desnutrición evita muchas veces la sensación de hambre". (85)

Se deben a la desnutrición no sólo la talla baja del mexicano sino también la escasa capacidad de trabajo, tanto físico como mental. (85)

Existen diferentes tipos de desnutrición, como son:

- 1) La desnutrición aguda y epidémica que es la que sigue a las grandes catástrofes.
- 2) La desnutrición regional y específica que es en la que se presenta una deficiencia de algún nutrimento, como puede ser la falta de yodo en una determinada región.
- 3) La desnutrición social que proviene de la pobreza y la explotación, de tal forma que es difícil desarraigarla; la desnutrición social no es asunto de individuos sino de grupos. Al respecto el Dr. Martínez opina: "La persona desnutrida vive e interactúa con personas también desnutridas y por otra parte su desnutrición proviene de generaciones anteriores y persiste durante toda la vida". (85)

Las opiniones de los diferentes investigadores de la dieta del mexicano, difieren en cuanto al valor nutritivo de ésta.

Para el Dr. Zubirañ nuestra dieta es mala ya que es insuficiente desde el punto de vista energético y proteínico. Aunque actualmente se agregan a la dieta, a base de maíz, alimentos como las frutas, las verduras, el frijol, el pan, el azúcar y las pastas, ésta es aun insuficiente por la ingestión poco frecuente de alimentos de origen animal. Por tanto, el aumento en el número de alimentos de origen vegetal, hace que esta dieta tenga mayor número de calorías, sin embargo, el nivel calórico de ésta, es ligeramente menor al establecido por la FAO y la WHO. Tales instituciones recomiendan como niveles adecuados para mantener una vida normal, los siguientes:

- 1) Para hombres de 70 Kg. de peso, la dieta debe proveer aproximadamente 2700 Kcal. y 56 g. de proteína por día o 0.8 g/Kg de peso corporal.
- 2) Para mujeres de 58 Kg. de peso, la dieta debe proveer 2000 Kcal. y 46 g. de proteína. (19)

Otra manera de establecer el valor adecuado de una dieta es el procedimiento que considera que las proteínas ingeridas deben proveer al organismo del 10 al 14% de la energía total de la dieta, (considerando que se obtienen 4.1 Kcal/g de proteína). La capacidad de trabajo de un individuo se puede afectar cuando ésta disminuye a menos del 8% en una dieta combinada de proteínas, vegetales y animales. Se considera además que la dieta diaria debe contener 30 g. de proteína de alta

tos la protección de los mismos. (6, 15, 29, 48, 49, 81)

Tanto en los alimentos africanos de fermentación láctica, como en las fermentaciones lácticas de cereales y leguminosas existe un incremento en el aminoácido lisina libre o disponible, lo que hace que el alimento aumente su porcentaje en el valor nutritivo (% RNV). Además se presenta una reducción del fitato de fósforo (mioinositol hexafosfato), el cual inhibe la  $\alpha$  amilasa y disminuye la disponibilidad de cationes multivalentes como el calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ), el magnesio ( $\text{Mg}^{+2}$ ), el hierro ( $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+3}$ ) y de proteínas con los cuales forma complejos insolubles. (5, 20, 27, 39, 55, 69, 78, 84)

Si consideramos a las fermentaciones como el conjunto de oxidaciones y reducciones que se llevan a cabo para que un microorganismo obtenga energía, tenemos que la glucólisis es el proceso mediante el cual un microorganismo convierte la glucosa a ácido láctico, o bien, mediante algunas variaciones a este proceso, microorganismos como las levaduras producen alcohol, mientras que, los organismos heterolácticos otros productos como los ácidos orgánicos. (9, 16)

Las ecuaciones balanceadas de la glucólisis y de la fermentación alcohólica son como sigue:

calidad (carne, leche huevos, pescado) para tener una nutri--  
ción adecuada, sin tomar en cuenta la calidad del resto de -  
las protefnas.

Por otra parte, los doctores Aguirre Beltrañ y Guillermo Bon-  
fil defienden nuestro tipo de dieta, al señalar que, en regio  
nes como el Mezquital, y la de los otomies, los habitantes -  
compensan las deficiencias del maíz, mediante la ingestión de  
alimañas como los huevecillos de mosca A xavacaatl, chumiles,  
gusanos de maguey, hormigas chiconas; los cuales dieron con  
tenidos notables de proteína, niacina, riboflavina, calcio, -  
fósforo y hierro, en sus análisis de laboratorio. También se  
ñalan que ingieren otros animales poco usuales como las ranas  
las ratas y las iguanas. Sin embargo, la ingestión de éstos  
no deja de ser ocasional, por lo que es insuficiente para una  
buena alimentación. Aunque estos investigadores difunden la  
dieta "indígena" o campesina, reconocen que es necesario mejo  
rarla, pero sin imponer a las comunidades otro tipo de alimen  
tos que pudieran desbalancear o afectar su dieta, por lo que  
es importante estudiar los alimentos y los potenciales ecoló  
gicos de cada región, de tal manera que su alimentación se me  
jore mediante modificaciones al alimento que ya se consume, o  
bien, por medio del consumo de otros alimentos que la región  
produce.

Partiendo de este criterio de mejora alimenticia sin afectar  
las dietas, varios investigadores han dirigido sus esfuerzos

al estudio de una serie de alimentos típicos con el fin de evaluarlos. El presente trabajo estudia algunas de las características de la producción de uno de estos alimentos típicos, denominado pozol, el cual se consume en el sureste de México. El pozol se produce por medio de la fermentación de masa de maíz y en el cual se presenta un incremento en el contenido proteínico de la misma, (15, 22), lo que hace evidente que un estudio más profundo de este alimento y de su proceso de producción, conducirá a elaborar alimentos de maíz más ricos en proteínas, con lo cual tendremos un pueblo con una mejor alimentación, sin modificar o desbalancear su dieta original; radicando en este hecho el objetivo fundamental y la importancia del presente trabajo.

## II OBJETIVOS

Analizar el efecto de la inoculación de masa con Agrobacterium azotophilum en la producción de proteína. Así como en otros aspectos bioquímicos, durante el proceso de fermentación que produce pozol.

### III GENERALIDADES

#### 3.1 FERMENTACIONES

##### 3.1.1 DEFINICION. TIPOS DE FERMENTACION.

La fermentación es una conversión de una materia prima a un producto de forma directa o indirecta, la cual se debe a la presencia de un microorganismo.

Las fermentaciones directas son aquellas cuyo producto es el microorganismo como es el caso de la biomasa celular, mientras que las fermentaciones indirectas son aquellas - en las que el producto se genera por la acción del microorganismo, como es el caso de la producción de enzimas, - penicilina, ácidos orgánicos entre otros.

Las fermentaciones pueden llevarse a cabo en estado líquido o en estado sólido.

- Las fermentaciones líquidas, que son las más estudiadas, generalmente se llevan a cabo en fermentadores.

En estos puede haber agitación, aereación y debe exis-

tir una regulación de temperatura y pH. Además pueden ser por lotes o continuas y en cuanto a su tamaño se dividen en: a) de laboratorio, b) de planta piloto, y c) industrial. (80)

- Las fermentaciones en estado sólido pueden ser de dos tipos: a) las alimentarias y b) las industriales. (53)
  - a) Las fermentaciones alimentarias son aquéllas que producen alimentos como lo son el queso, el pozol, el tempeh, el koji, entre otros. Este tipo de fermentación se realiza generalmente a nivel casero, directamente por el consumidor, aunque algunas, -como el queso-, se elaboran en grandes volúmenes en la industria.
  - b) Las fermentaciones de tipo industrial son las que se utilizan para la producción de enzimas (como -proteasas y amilasas), metabolitos y vitaminas.

El cuadro No. 1 representa un cuadro sinóptico de estas divisiones.

Algunas de las diferencias que se presentan entre las fermentaciones líquidas y sólidas, son las siguientes:

- a) En las fermentaciones líquidas los productos se encuentran diluidos en el medio, por lo que es necesario concentrarlos. Esto no sucede en las fermentaciones sólidas.

- b) Los cultivos de microorganismos que se utilizan en las fermentaciones líquidas deben manejarse en condiciones muy ascépticas, lo cual no es necesario en las fermentaciones sólidas.
  
- c) Las fermentaciones líquidas requieren condiciones de aereación, agitación, que generalmente no son necesarias en las fermentaciones sólidas.
  
- d) Se requiere un tratamiento de los líquidos sobrantes o resultantes de la fermentación líquida, lo cual no es necesario en las fermentaciones sólidas.
  
- e) Las fermentaciones sólidas representan un costo menor que las líquidas, ya que no demandan un gasto de energía, tratamiento de aguas residuales y otros gastos. Sin embargo, las fermentaciones sólidas presentan el inconveniente de no encontrarse suficientemente estudiadas.

En general, las fermentaciones sólidas presentan los siguientes problemas:

- a) Es difícil el desarrollo de los cultivos de microorganismos en forma homogénea en el estado sólido.
  
- b) Es difícil el control del crecimiento del microorganism

mo en las condiciones ambientales que prevalezcan.

c) Es difícil la regulación de la temperatura. (53)

En el cuadro No. 2 se presenta un cuadro comparativo de estos tipos de fermentación.

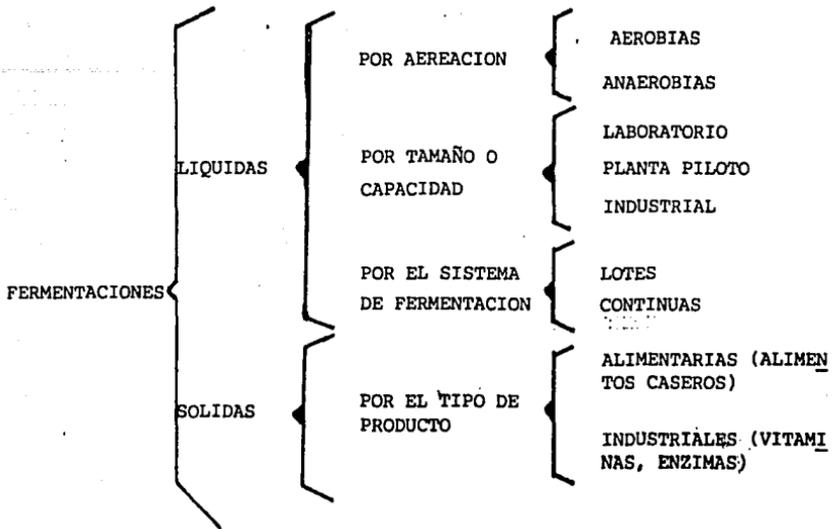
### 3.1.2 FERMENTACIONES DE LOS CEREALES Y ALMIDONES

La fermentación y el secado son los dos métodos más antiguos de preparación y conservación de los alimentos. Aunque las características físicas y químicas originales de los alimentos se alteran durante la fermentación, sus valores nutritivos se mantienen. (50)

Existen muy pocas fermentaciones de cultivos puros en los alimentos. La sucesión de crecimiento de diferentes especies se puede considerar como secuencia natural. En general, el crecimiento de microorganismos se inicia con bacterias, después con levaduras y por último con hongos filamentosos, si las condiciones son aptas para el crecimiento de éstos. (50)

CUADRO No. 1

DIVISION DE LAS FERMENTACIONES



CUADRO No. 2

CUADRO COMPARATIVO DE LAS FERMENTACIONES SOLIDAS Y LIQUIDAS

DESCRIPCION	F. LIQUIDAS	F. SOLIDAS
Conocimientos fisiológicos	Muy buenos	Regulares
Conocimientos tecnológicos	Muy buenos	Regulares
Manutención de las condiciones óptimas	Más fácil	Más difícil
Control de pH	Mayor	Menor
Los productos excretados - se encuentran	Diluidos	Concentrados
Volumen del aparato	Elevado	Regular
Tratamiento de efluentes	Si	No
Gasto de energía	Importante	Regular
Protecciones requeridas	Elevadas	Reducidas

Dr. Rimbault (53)

Los cereales son las semillas secas de las plantas gramíneas las cuales son ampliamente cultivadas por sus granos que son de gran importancia en la alimentación humana.

Los principales cereales son: trigo, centeno, cebada, avena, maíz, arroz, mijo, sorgo y entre ellos, los más importantes son: el trigo, el maíz y el arroz.

Los cereales son una buena fuente de hidratos de carbono, aunque también contienen proteínas, grasas y algunas vitaminas y minerales. (17)

Los microorganismos en las fermentaciones, siguen un orden de ataque a los nutrimentos, el cual es como sigue: primero los hidratos de carbono, después las proteínas y por último las grasas. Aun dentro de los hidratos de carbono también se tiene un orden de ataque: primero los azúcares, luego los alcoholes y por último los ácidos. Por otra parte, las formas de obtención de energía de un microorganismo, en orden de preferencia, para los diferentes enlaces de carbono son:  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}$ ,  $\text{CHOH}$  y  $\text{COOH}$ . (17)

Los azúcares pueden ser fermentados por los distintos microorganismos en diversas formas: por oxidación completa, por oxidación parcial, por fermentación alcohólica, por fermentación láctica, por fermentación butírica y por otras acciones fermentativas menores. Una de las fermentaciones más comunes es la oxidación parcial del azúcar a -

un ácido, como por ejemplo el ácido cítrico. Las levaduras son más eficientes en la producción de alcohol, aunque también los hongos filamentosos y las bacterias pueden producirlo. La fermentación láctica es de gran importancia para la conservación de alimentos debido a la presencia del ácido láctico como producto terminal, el cual se encuentra en tales cantidades, que controla la contaminación por otros organismos. Los otros tipos de fermentación son menos comunes y pueden producir: malos olores -- como en el caso de las fermentaciones butíricas-, o deteriorar la textura y/o el sabor de los alimentos, cuando se trata de fermentaciones en las que el microorganismo ataca a los hidratos de carbono superiores como la celulosa, el almidón, la hemicelulosa y la pectina. (17, 26)

Los almidones pueden provenir de diferentes vegetales como los tubérculos, los cereales, algunos frutos y algunas leguminosas. Entre los más comunes encontramos a la papa, al maíz, al plátano, a la yuca, y al frijol por mencionar algunos.

Los almidones y cereales presentan dos tipos principales de fermentación, que son: la fermentación alcohólica y la fermentación láctica. Para que tengan lugar estas fermentaciones debe realizarse una sacarificación en forma previa. Dicha sacarificación, puede llevarse a cabo por medio de la acción de enzimas, la adición de maltas o de --

ácido clorhídrico, o bien por la acción de hongos filamentosos según las costumbres de cada país. (56, 84)

Las fermentaciones alcohólicas se encuentran ampliamente difundidas en todas las culturas. Entre los productos más conocidos encontramos a la cerveza (cebada), al saque (arroz), al tesglino (maíz), al quebranta huesos (maíz), al tepache (de maíz o de piña). Además de la producción de alcohol a partir del maíz del plátano o de la yuca. -- (14, 77)

A pesar de lo anterior, en muchas de las culturas, que habitan en Africa y América, es frecuente el consumo de alimentos preparados mediante la fermentación láctica de cereales, algunas leguminosas o de yuca. Algunos de estos alimentos son: el uji, el koko, el oggi, el agidi, el ken key en Africa, el almidón ácido de yuca en Colombia, y el pozol en México. Una lista mas completa se da en el cuadro No. 3. (1, 3, 4, 7, 10, 14, 24, 45, 46, 48, 49, 51, - 57, 59, 60, 77, 78)

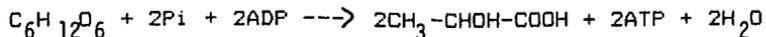
Estas fermentaciones las llevan a cabo microorganismos homolácticos y heterolácticos por lo que se encuentran, como productos: ácido láctico, ácido acético y alcohol etílico, entre otros, con el consiguiente descenso del pH. La acción bacteriostática de los ácidos producidos aunada al descenso del pH, permiten en la producción de alimen--

CUADRO No. 3

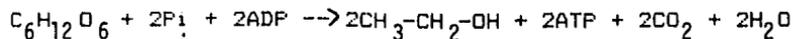
ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

HOMBRE	AREA	ORGANISMOS	SUBSTRATO	NATURALEZA Y USO
Selai Baye (Chikang, Bony, Toyo, Kanjang, Kocap, Saeon)	Oriente	<u>Aspergillus Oryzae</u> , <u>Penicillium fulviginosum</u> , <u>Lactobacillus delbrueckii</u>	Soya, Trigo	Liq. rojizo cavaero salado, agente saborizante.
Miao (Chiang, Domjong, Pasta de soya, Tsaoc)	Oriente	<u>Aspergillus Oryzae</u> , <u>Saccharomyces cerevisiae</u> , <u>Penicillium edamushi</u> , <u>Penicillium listaium</u>	Soya entera, arroz o edam	Pasta café, agente saborizante
Frijol fermentado (Harvatto, Tamsuh, Tso-si)	Oriente	<u>Aspergillus, Streptococcus, Lulovarsium</u>	Soya entera, harina de trigo	Frijoles suaves casi negros, - salado, condimento
Sufu (Fu-fu, Fu-yu, Tso-fu-yu, Pastel de frijol, Queso chino)	China	<u>Actinomyces albus</u> , <u>Mucor</u> <u>Dispersus</u>	Cajado de soya (Tofu)	Queso tipo queso crema, salado, condimento
Tumpah (Tupa kabaloo)	Indonesia y Vecindades	<u>Rhizopus oligosporus</u>	Soya entera	Frijoles verdes por micelio - queso pastel compacto, substituto de carne o botana
Oncom (Oncom)	Indonesia	<u>Humicola intermedia</u>	Pastel preparado de caobusta	Similar al Trigo
Hatto	Japan	<u>Bacillus licheni</u> (B. Sakei - lina)	Soya entera	Pastel compacto como substituto de carne
Lao-Chao (Chiu-tiang, Tapa Ye - tan)	China, Indonesia	<u>Aspergillus Nochi</u> , <u>Rhizopus Oleraceus</u> , <u>Saccharomyces Philiformis</u> , <u>Saccharomyces Pilosus</u>	Arroz glutinoso - (variedad arroz - del arroz)	Arroz suave, jugoso, dulce y ligeramente alcohólico
Ang-Kak (Arroz rojo anka)	China, Filipinas	<u>Mucorpus purpureus</u>	Arroz	Arroz rojo, agente colorante
Edli	India (Daga cialmente - en el Sur)	<u>Levaduras, Leuconostoc sa - asteroides</u>	Arroz, garbanzo - negro o/cáscara	Pastillitas
Dosa (Dosa)	India	<u>Levaduras, Leuconostoc sa - asteroides</u>	Arroz, garbanzo negro o/cáscara	Pastillitas muy azucaradas
Turhana	Turquia	Lácticos	Cerde de trigo - preacido y yogurt (Zit)	Soco, usado en sopa
Injera	Etiopia	<u>Candida guilliermondii</u>	Teff (Eragrostis tef)	Panec en forma de pastillitas
Kishk (Kishk)	Egipto, Siria	Bacterias del ácido láctico	Trigo, leche	Bolas azúca
Ogi	Dahomey, Nigeria	Hongos filamentosos y bacterias	Miiz	Atole de cereal
Quveza de scopy	Sud-Africa	Levaduras y lácticos	Miiz, sorgo	Bebida ligeramente ácida
Mihou (Mhgo)	Sud-Africa	<u>Lactobacillus delbrueckii</u> y otros lácticos	Miiz	Bebida ácida
Arroz fermentado (Arroz de la sierra)	Ecuador	<u>Aspergillus flavus</u> , <u>A. candidus</u> , <u>Bacillus subtilis</u>	Arroz sin descascarillar	Arroz seco amarillo-café
Pamol	Suroeste de México	Complejo de hongos filamentosos, bacterias y levaduras	Miiz	Bebida
Koko	Africa	<u>Candida guilliermondii</u>	Miiz de Gana	Atole o harina
Kiskey, Kerkey c/sal	Gana	<u>Lactobacillus acidophilus</u>	Miiz de Gana	Bolas de atole

## Fermentación láctica (glucólisis)



## Fermentación alcohólica

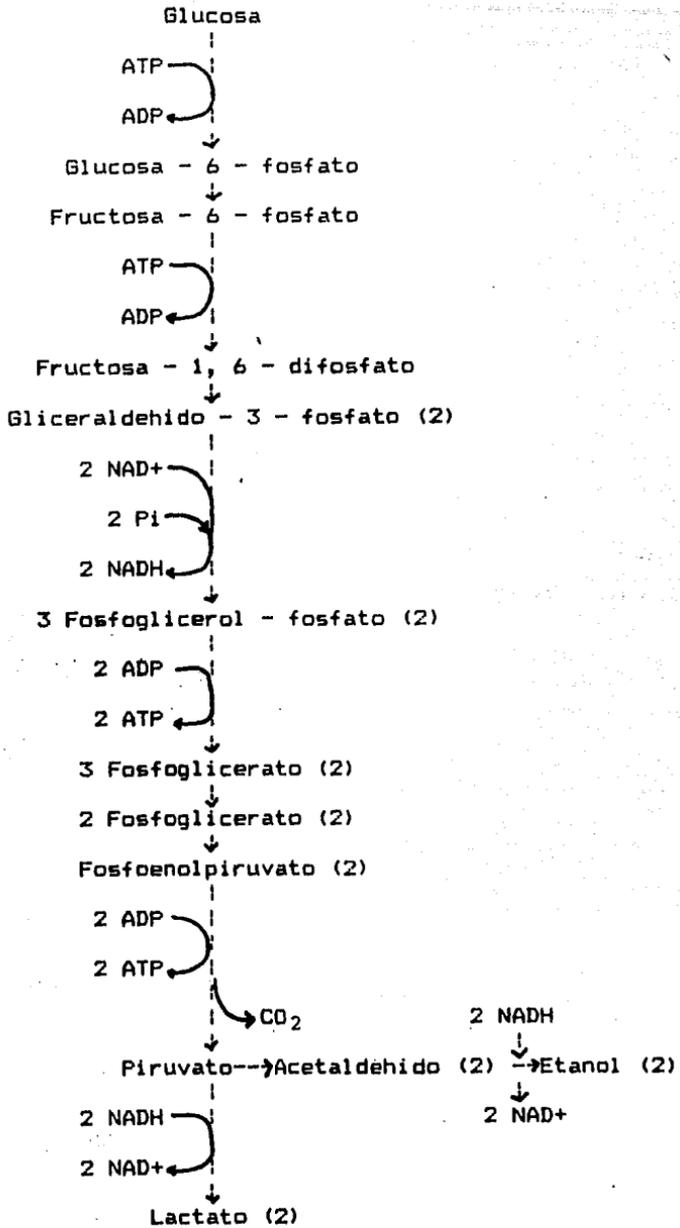


Lehninger (40)

El proceso de la glucólisis, es como se muestra en el esquema No. 1

### 3.1.3 FERMENTACIONES DE MAIZ

Tanto en Africa como en Latinoamérica se encuentran ampliamente difundidos los alimentos fermentados del maíz, ya que éste es uno de los principales cultivos alimenti--



Brock (9), Lehninger (40).

cios de estas regiones del mundo. (14)

Entre ellos, se conocen un gran número de productos de --  
fermentación láctica, la cual ocurre en forma natural --  
cuando se mezcla el maíz con agua. (20)

Entre los alimentos fermentados de maíz, que se consumen  
en Africa, tenemos el Koko y el Oggi de maíz. (1, 7) Al-  
gunos de los que se consumen en México son los que se --  
muestran en el cuadro No. 4.

### 3.2 FIJACION DE NITROGENO

Los organismos requieren del nitrógeno para su supervivencia,  
pero éste lo deben adquirir en forma de aminoácidos (humanos)  
nitratos, nitritos o amoníaco, dependiendo de cada microorga-  
nismo. Tan sólo unos cuantos organismos son capaces de utili-  
zar nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ), el cual transforman a amonia-  
co ( $NH_3$ ). A tales microorganismos se les denomina fijadores  
de nitrógeno.

El ciclo de nitrógeno, en medio acuático, se puede esquemati-

C U A D R O No. 4

BEBIDAS FERMENTADAS DE MAIZ QUE HAN SIDO CONSUMIDAS O QUE SE CONSUMEN EN VARIOS LUGARES DE MEXICO

NOMBRE	TIPO DE ALIMENTO	ESTADO	EPOCA DE CONSUMO
1.- Agua agria	Bebida no embriagante	San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Guerrero, D.F., Tlaxcala, Michoacán, Jalisco y Oaxaca.	Colonial a la actual
2.- Atole	Bebida no embriagante	Abarca los mismos estados que agua agria.	Colonial a la actual
3.- Atole agrio	Bebida no embriagante	Abarca los mismos estados que agua agria.	Colonial a la actual
4.- Cuauapala	Bebida embriagante	Puebla: Tehuacán	Colonial
5.- Charujua	Bebida embriagante	Abarca los mismos estados que agua agria.	Colonial
6.- Pozol	Bebida no embriagante	Tabasco, Chiapas, Yucatán, Oaxaca, Veracruz, Guerrero y el territorio de Quintana Roo.	Colonial
7.- Ostoche	Bebida embriagante	D.F., Edo. de México	Colonial
8.- Quebrantahuesos	Bebida embriagante	Quanajuato	Precortesiana a la actual
9.- Sendeño	Bebida embriagante	Estado de México	Colonial
10.- Tepache	Bebida embriagante	Veracruz, Puebla, Guerrero, Oaxaca, y Chiapas	Precortesiana a la actual
11.- Tesguifio	Bebida embriagante	Sonora, Chihuahua, Nayarit, Zacatecas y Jalisco.	Precortesiana a la actual
12.- Vino de caña	Bebida embriagante	Edo. de México y Morelos	Colonial

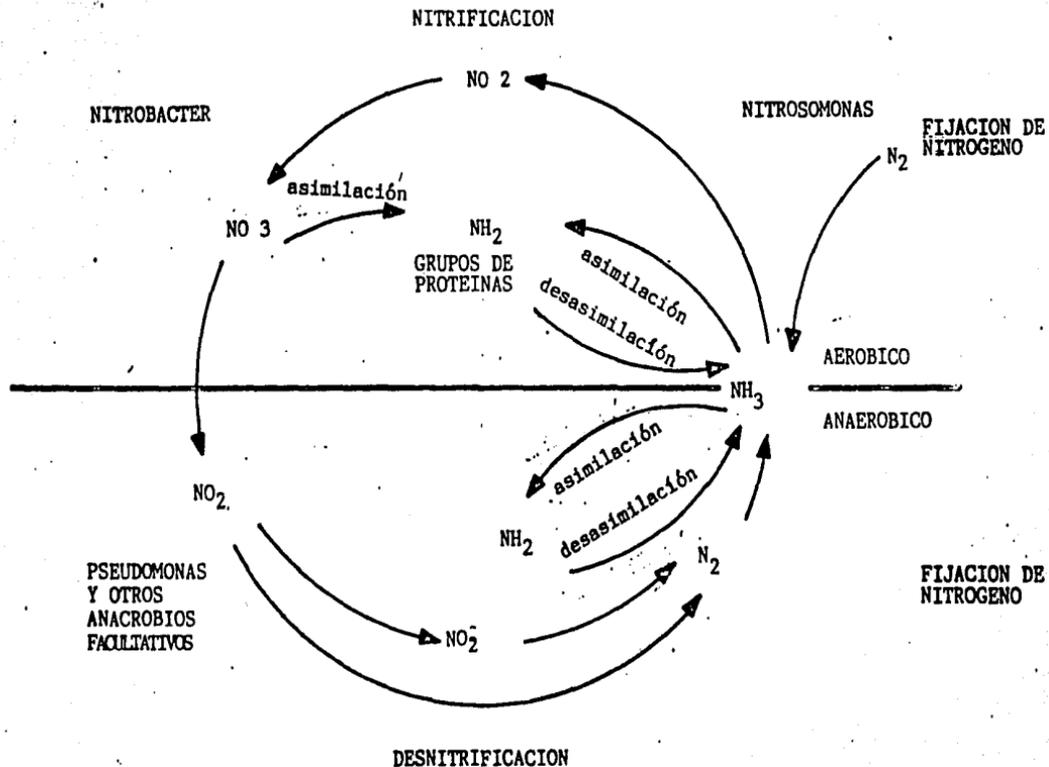
zar como se muestra en el esquema No.2 .

Aunque los estudios sobre la fijación de nitrógeno son limitados, se encontró que la constante de Michaelis-Menten ( $k_M$ ) es menor a 0.02 atm. de nitrógeno, lo cual indica que se encuentra saturado, ya que la presión de nitrógeno en el aire es de aproximadamente 0.8 atm. (40). Por otra parte, tenemos que a aquel microorganismo capaz de reducir acetileno a etileno a  $(CH\equiv CH \rightarrow CH_2=CH_2)$  puede en la misma forma reducir el grupo azo ( $H-NEN$ ) y al cianuro ( $H-CN$ ). La reducción de acetileno da lugar a una prueba importante de la fijación de nitrógeno, ya que por medio de la cromatografía de gases se pueden separar y cuantificar cada uno de ellos. (40)

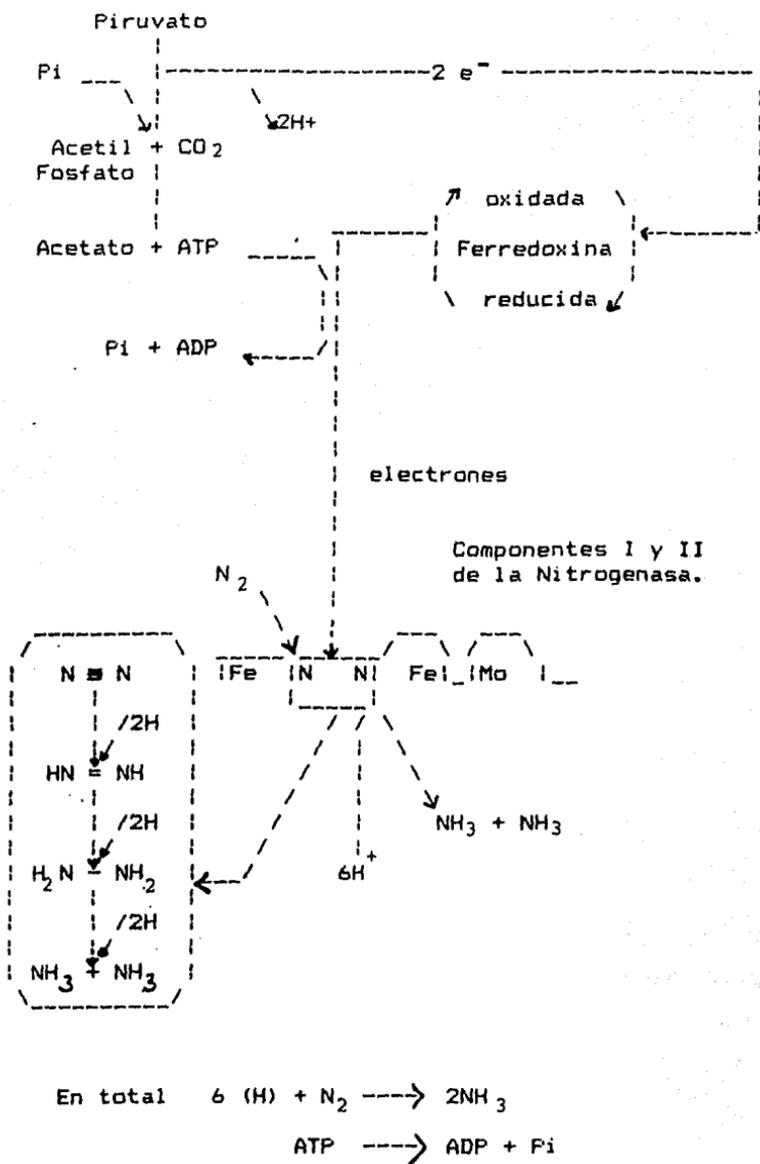
Más tarde se encontró que esta fijación de nitrógeno se debía a la presencia de cualquiera de las siguientes proteínas: la ferredoxina, que contiene en su estructura un hierro (Fe), o la flavodoxina, que contiene un flavin mononucleótido (FMN). (16, 40)

Además se encontró un sistema de enzimas al que se denominó sistema de nitrogenasa, el cual, consta de dos proteínas, las cuales no presentan actividad por sí solas. La proteína Mo-Fe (PM 20,000) contiene molibdeno, hierro y azufre (2:32:25-30) y la otra proteína Fe contiene únicamente hierro y tiene un PM de 60,000. Estas proteínas están presentes en una razón de 1:2. (40, 62)

ESQUEMA No. 2  
CICLO DEL NITROGENO EN MEDIO ACUATICO.



ESQUEMA No. 3. REDUCCION DE NITROGENO A AMONIO.



El esquema No. 3 representa los pasos en la reducción de nitrógeno a amonio.

### 3.2.1 MICROORGANISMOS FIJADORES DE NITROGENO

Como ya dijimos no todos los microorganismos pueden obtener el nitrógeno para subsistir a partir del nitrógeno atmosférico por lo que a continuación damos una pequeña lista de estos.

Entre los microorganismos que se encuentran en forma libre tenemos: a) aerobios y b) anaerobios.

a) Entre los aerobios nos encontramos organismos heterótrofos -como las bacterias Azotobacter spp., Klebsiella, Beijerinckia y Bacillus polymyxa-, y entre organismos fotosintéticos como las algas verde-azules.

b) Entre los anaerobios también existen organismos heterótrofos; representados por las bacterias Clastidium spp y los organismos fotosintéticos como las bacterias Chromatium, Chlorobium y Rhodospirillum.

Mientras que en simbiosis se presentan las plantas legumi

nosas y las plantas no leguminosas. Entre las primeras tenemos a la soya, los guisantes, el trébol, el algarrobo etc., en asociación con bacterias del género Rhizobium. Entre las no leguminosas tenemos a: Alnus, Myrica, Ceanothus, Comptonia casuerina en asociación con microorganismos filamentosos como los Actinomicetos. Brock (9)

Entre los trabajos realizados sobre microorganismos fijadores de nitrógeno, se encontró que el Clostridium butyricum puede crecer en situaciones "aeróbicas" cuando se encuentra en crecimiento con algún microorganismo aerobio el cual crea una cierta anaerobiosis. Algunos de estos microorganismos son: Pseudomonas azotogenesis, levaduras, o bien, microorganismos de los géneros Bacillus Sp y Enterobacter sp. (41)

En los estudios realizados en los alimentos fermentados - típicos mexicanos, por los investigadores Herrera T., Taboada J. y Ulloa M., se encontraron microorganismos fijadores del nitrógeno atmosférico. Algunos de estos alimentos son tesguino, el pulque y el pozol. (33, 65, 68, 70)

Los doctores Muñoz D. y Viniegra González realizaron estudios sobre la fijación de nitrógeno de bacterias como Azotobacter chroococcum, al inocularse el medio de cultivo que contiene Lactobacillus buchneri, en comparación con los cultivos puros. (47)

### 3.2.2 CARACTERISTICAS GENERALES DEL MICROORGANISMO EN ESTUDIO.

El microorganismo que se aisló del pozol y que fija nitrógeno atmosférico es el Agrobacterium azotophilum. (65)

"El Agrobacterium azotophilum sp nov." (72) es un bacilo cocoide o cilíndrico con los extremos redondeados, que mide 0.8 - 1.5 x 1.5 - 3.5 micras, las cuales se encuentran en pequeños grupos, que se embeben en mucílago, o bien, - de forma aislada; poseen cápsulas bien desarrolladas y no presentan endosporas; son móviles por medio de pocos flagelos peritricos o más frecuentemente un flagelo lateral o subpolar. Son bacilos gram negativos y no acidorresistentes. Su temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 30°C. (72)

#### CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS

Las colonias en gelatina son: pequeñas, blancas, cremosas brillantes, fluorescentes.

Las colonias en agar de medio basico 77 de Fred y Waksman con lactato de calcio como fuente de carbono son: peque--

ñas, blancas, translúcidas, mucilaginosas \*1

Las colonias en agar nutritivo son: pequeñas, lisas, blanco amarillentas, cremosas, viscosas, brillantes, circulares, convexas. En la estría en este medio se forman numerosas colonias pequeñas blanquesinas, translúcidas. (72)

Presenta un buen crecimiento en diversos medios de cultivo como son: caldo nutritivo, el caldo de agua de mar, el caldo peptonado y en medio básico 77 de Fred y Waksman -- con etanol como fuente de carbono, crecimiento en medios como el V-8 agar (el cual se prepara a partir del jugo de ocho verduras: tomate, perejil, apio, betabel, zanahoria, lechuga, berro y espinaca) y en extracto de malta agar, - es muy abundante. (72)

No presenta crecimiento en caldo de urea.

---

\*1 Esta fuente de carbono fue sugerida al comienzo de este trabajo por el Dr. M. Ulloa al Dr. Leal, por lo que esta caracterización pertenece a nuestra propia apreciación.

## CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS

Produce indol después de dos o tres días. No produce sulfuro de hidrógeno en los medios de Kleger, de Zo-Bell y de Feltham. Hay producción de ácido pero no de gas en presencia de glucosa, sacarosa, xilosa y no se produce ni gas, ni ácido en presencia de galactosa, maltosa, lactosa, rafinosa, dextrina, almidón, inulina y glicerol.

(72)

No hidroliza almidón y aunque crece en medio de leche tor nasoleada no digiere la caseína.

En caldo nutritivo de nitrato de potasio: se producen nitritos a partir de nitratos; no se registra producción de gas en tubo de Durham y el medio se torna alcalino después de ocho días. (72)

Puede utilizar como única fuente de nitrógeno los nitratos y el cloruro de amonio y como única fuente de azufre el azufre inorgánico. (70). La prueba de reducción de acetileno da positiva para la fijación de nitrógeno atmosférico cuando se encuentra en medio de masa de maíz. (65, 72)

Da positiva la prueba de rojo de metilo, pero no produce ni trimetilamina ni acetilmetilcarbinol. (72)

Es un microorganismo aerobio y anaerobio facultativo. Su habitat natural es el pozol que proviene de las zonas calientes de Chiapas, Campeche y Tabasco. (72)

Los investigadores Herrera, Taboada y Ulloa en diversos trabajos sobre la fijación de nitrógeno por este microorganismo, realizaron variantes en cuanto a la fuente de carbono que se utilizó, y en cuanto al crecimiento de cultivos monoespecíficos y mixtos con el Enterobacter aerogenes, microorganismo que también se aisló del pozol. Algunos resultados de estos trabajos se muestran en los cuadros Nos. 5, 6 y 7. (65, 67, 68, 70 )

Otros estudios se enfocaron al efecto de la adición de aminoácidos a un medio básico carente de nitrógeno en donde se dedujo que - salvo en el caso de la metionina -, en general, las dosis de 10  $\mu$ g de aminoácido no inhiben la reducción de acetileno, y por tanto la fijación de nitrógeno; mientras que para las dosis de 0.05 mM/ml, se inhibe la fijación de nitrógeno y aumenta la densidad del cultivo. (66).

En el estudio sobre inhibidores de la fijación de nitrógeno de este microorganismo, se encuentra que ésta se inhibe por la presencia de: sustancias nitrogenadas (nitratos, nitritos, o amonio), hidroxilamina, mezclas de aminoácidos, glicina, DL-ácido aspártico, D-ácido glutámico, -

C U A D R O No. 5

REDUCCION DE ACETILENO A ETILENO EN CULTIVOS MONOSPECIFICOS Y MIXTOS DE *A. AEROGENES* Y *A. AZOTOPHILUM* EN ATOLE DE MASA DE MAIZ Y EN MEDIO 77 CON DIFERENTES FUENTES DE CARBONO, INCLUIDAS 24 HORAS A 26°C

MEDIOS DE CULTIVO	<u>A. AEROGENES</u>		<u>A. AZOTOPHILUM</u>		<u>A. AEROGENES</u> y <u>A. AZOTOPHILUM</u>	
	AER.	ANAER.	AER.	ANAER.	AER.	ANAER.
Atole de masa de maiz	2+	3+	2+	2+	2+	3+
77 con las fuentes de carbono:						
D-Glucosa	+	+	-	±	+	+
D-Galactosa	+	+	-	-	+	+
Fructosa	-	+	-	-	-	+
Sucrosa	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	-	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-	-
Trehalosa	+	+	-	-	2+	2+
D-Manitol	-	-	-	-	-	-
Almidón soluble	±	+	-	-	+	+

- No hubo formación de etileno

± Trazas de etileno

+ a 3+ Cantidades crecientes de etileno

CUADRO No. 6

REDUCCION DE ACETILENO A ETILENO, EN AEROBIOSIS Y EN ANAEROBIOSIS, EN SUSPENSION ACUOSA AL 33% DE TIERRA NEGRA HUMIFERA SOLA Y ADICIONADA DE DIVERSAS SUBSTANCIAS, CON Y SIN INOCULO DE A. AZOTOPHILUM

CONDICIONES EXPERIMENTALES (A, con <u>A. AZOTOPHILUM</u> )	AEROBIOSIS	ANAEROBIOSIS
Tierra sola esterilizada	-	-
Tierra sola esterilizada +	-	-
Tierra sola no esterilizada	-	-
Tierra sola no esterilizada + A	+	+
Tierra esterilizada + 2% de etanol + A	2+	2+
Tierra + 2% de manitol, esterilizada + A	2+	2+
Tierra + 10% de masa de maíz* esterilizada + A	2+	2+
Tierra + 10% de aguamiel esterilizada + A	+	+
Tierra + 10% de cachaza esterilizada + A	3+	2+
Tierra no esterilizada + una asada de cachaza + A	+	+
Tierra esterilizada + una asada de cachaza + A	+	+
Tierra esterilizada + una asada de cachaza	-	+
Tierra no esterilizada + una asada de cachaza	+	+
Tierra no esterilizada + 10% de jugo de caña	-	+
Tierra + 10% jugo de caña esterilizada + A	+	+
Tierra + 4% de mesaza, esterilizada + A	2+	2+
Tierra no esterilizada + 20% de vinaza	+	)
Tierra + 20% de vinaza, esterilizada + A	+	+
Tierra no esterilizada + 5% de polvo de lirio acuático	2+	3+
Tierra no esterilizada + 5% de polvo de lirio acuático + A	4+	+
Tierra + 5% de polvo de lirio acuático esterilizada + A	2+	-

No hubo producción de etileno a partir de acetileno; + a 4+, cantidades crecientes de etileno producido; \*suspensión acuosa de harina de maíz marca Minsa (maíz hervido en agua de cal, secado y molido).

C U A D R O No. 7

REDUCCION DE ACETILENO A ETILENO, EN AEROBIOSIS Y EN ANAEROBIOSIS, EN SUSPENSION ACUOSA DE MASA DE MAIZ AL 10% SOLA Y ADICIONADA DE DIVERSAS SUBSTANCIAS, CON Y SIN INOCULO DE A. AZOTOPHILUM.

CONDICIONES EXPERIMENTALES (A, CON <u>A. AZOTOPHILUM</u> )	AEROBIOSIS	ANAEROBIOSIS
Masa sola esterilizada + A	2+	2+
Masa + 2% de sacarosa, no esterilizada	-	-
Masa + 2% de sacarosa, esterilizada + A	2+	+
Masa + 4% de aguamiel no esterilizada	2+	3+
Masa + 4% de aguamiel, esterilizada + A	4+	2+
Masa + 10% de jugo de caña, esterilizada + A	-	-
Masa + una aseda de cachaza	+	2+
Masa + 10% de cachaza, esterilizada + A	2+	3+
Masa + 4% de melaza, no esterilizada	-	-
Masa + 4% de melaza, esterilizada + A	-	-
Masa + 4% de pulque, esterilizada + A	+	-
Masa + 20% de viraza, no esterilizada	-	-
Masa + 5% de viraza, no esterilizada	-	-
Masa + 5% de viraza, esterilizada + A	4+	2+

Taboada etal (67)

L-prolina, DL-glicina, DL, L' y D-alanina, L-asparagina, -  
L-histidina. Algunos de los aminoácidos probados como --  
isoleucina, leucina, metionina, así como el trifosfato de  
adenosina (ATP) no inhiben la reducción de acetileno, aun  
a concentraciones de 50 a 100 mg/20 ml de medio. (31).

En cuanto a otras propiedades del A. azotophilum se tiene  
un estudio acerca de su antagonismo sobre diversas espe-  
cies de bacterias y hongos, además de la antibiosis a cin-  
co especies del género Penicillium aisladas del pozol. (35  
73).

### 3.3 EL POZOL.

El pozol se define como la masa de maíz fermentada, la cual -  
al desleirse en agua y en crudo constituye una bebida refres-  
cante, la cual es el alimento básico de algunos grupos indíge-  
nas en el sur y sureste de México, como lo son los chamulas, -  
los lacandones, y mestizos de dichas zonas. (30, 75)

El pozol se prepara, en la forma tradicional, a partir del ma-  
íz blanco, el cual se hierve con polvo de lima que contiene -  
al inicio aproximadamete un 10% de  $\text{Ca(OH)}_2$  p/v, y una vez que  
se lava y se elimina el pericarpio el nixtamal se muele hasta  
obtener una masa.

Con esta masa se forman bolas de 10 a 12 cm. de largo y de 5 a 8 cm. de ancho, que se envuelven en hojas de plátano. Según la región en la que se prepare, el pozol presenta variaciones como puede ser la adición de cacao molido, el cual le confiere un sabor diferente. (13, 75)

El pozol se consume en la región sur y sureste de la República Mexicana y comprende principalmente los estados de Chiapas, Tabasco, Campeche y Yucatán, aunque también se consume en menor escala en algunas zonas de Oaxaca, y Veracruz. La población que lo consume es tanto indígena como mestiza. (75)

Entre los estudios sobre el pozol se pueden mencionar el del Dr. Cravioto et al (13), que fué de los primeros en estudiar tanto el pozol como el maíz a partir del cual se preparó. En este trabajo se determinó un mayor contenido de proteínas en el pozol que en el maíz. Asimismo en los aminogramas se determinaron mayores concentraciones de los aminoácidos lisina, metionina y triptofano, mientras que en el estudio de las vitaminas se encontraron mayores concentraciones de riboflavina y de niacina para el pozol. Además, se determinó que el pozol contiene mejores proteínas como resultado del cambio en la composición de aminoácidos. Los estudios que se realizaron en relación de eficiencia proteínica (PER) en ratas, mostraron que el PER para el maíz fué de  $1.10 \pm 0.227$ , mientras que para el pozol fué de  $1.56 \pm 0.07$ . (13).

Otros investigadores como Herrera T. y Ulloa M. principalmente, estudiaron la microflora del pozol. En estos estudios se encontró que los microorganismos aerobios son más abundantes que los anaerobios o microaerofílicos como se muestra en el cuadro No. 8. Asimismo, es probable que existan bacterias microaerofílicas de los géneros Lactobacillus sp y Propionibacterium. Además se considera, en general, que los hongos filamentosos constituyen invasiones secundarias y no intervienen de manera importante en la fermentación de la masa, ya que aparecen tardíamente y en forma más o menos localizada con excepción del género Geotrichum candidum que se aisló en forma homogénea de la masa fermentada. (30).

Entre los microorganismos encontrados se aislaron e identificaron las bacterias: Pseudomonas mexicana, Escherichia coli var. neapolitana, Bacillus cereus, Paracolobactrum aerogenoides, Chromobacterium pozolis, Agrobacterium azotophilum. (22, 72, 75). Dentro de las levaduras se encontraron: Candida kruzei, Trichosporon cutaneum, Hansenula fabianii, Candida guilliermondii, Kluyveromyces fragilis, Candida parapsilosis, C. tropicalis. (32, 34, 36, 75, 76). Y dentro de los hongos filamentosos se encontraron: Aurobasidium pullulans, Cladosporium herbarum, Epicoccum sp., Neurospora sitophila, Fusarium spp., Geotrichum candidum, Monilia sitophila, Mucor racemosus, Mucor rouxianus, Paecilomyces fumosoroseus, Rhizopus stolonifer, Trichodema viridae, Penicillium claviforme, P. lanosoviridae, P. expansum, P. italicum, P. cyclospium, Phialophora ri-

C U A D R O No. 8

RECuento DE LOS MICROORGANISMOS DEL POZOL OBTENIDOS EN VARIOS MEDIOS DE CULTIVO EN CONDICIONES DE AEROBICIDAD Y ANAEROBICIDAD O MICROAEROFILIA DESPUES DE 3 DIAS DE INCUBACION A 26° C

	NUMERO DE MICROORGANISMOS/G*	
	BACTERIAS	LEVADURAS
<b>AEROBIOSIS</b>		
Harina de maíz agar	227 x 10	127 x 10
Harina de maíz agar con caldo nutritivo	160 x 10	100 x 10
Papa dextrosa agar	175 x 10	100 x 10
Malta sal agar	0	84 x 10
Pozol agar	4 x 10	78 x 10
<b>ANAEROBIOSIS O MICROAERO- FILIA</b>		
Caldo de tioglicolato agar	355 x 10	63 x 10

\* Los recuentos se hicieron en las cajas que presentaron un mayor número de colonias.

Herrera T. y Ulloa M. (30)

chardisiae. (35, 71, 74, 75).

Otros trabajos de los investigadores Herrera T. y Ulloa, et al, se han centrado en el estudio de cada uno de los microorganismos que se aislaron del pozol, así como su posible desarrollo en medios carentes de fuentes de nitrógeno y no en el estudio directo sobre el pozol. (71, 73)

#### IV METODOS

##### 4.1 PREPARACION DE MASA PARA LA FERMENTACION.

El maíz se nixtamaliza con 2% (p/p) de  $\text{Ca(OH)}_2$  y con agua en una proporción (3:1, agua:maíz), con un tiempo de cocción de 40 min y un reposo de 15 hr. (18,37)

La humedad inicial del grano de maíz fue de 5.11% después de la cocción fué de 31.00% y después del reposo de 39%.

Después de lavarlo se molió en el cedazo de 1/8 de pulgada para obtener un molido grueso y por último se le adicionó el agua para alcanzar, después de amasar, una humedad del 61%; que es la humedad que reportan Cravioto et al. en 1955. (13)

En el caso del testigo o control el procedimiento que se siguió fué éste y en el caso del material con inoculación del microorganismo (A. azotophilum) la adición de agua para alcanzar la humedad del 61% se realizó mediante la adición del medio de cultivo con el microorganismo y el resto del agua en la misma forma que en el control.

#### 4.2 PREPARACION DEL INOCULO.

En el medio de cultivo 77 de Fred y Waksman lactato de calcio se inocularó una solución del microorganismo con una D.O. de 0.15 a una  $\lambda = 500$  nm al 10% (v/v) y después de 4 días de incubación a 26° C, cuando el inóculo tenía una D.O. de 0.15, se utilizó como inóculo para la masa.

El medio de cultivo 77 de Fred y Waksman lactato de calcio se prepara de acuerdo a la siguiente formulación:

Lactato de calcio	10.00 g
$K_2HPO_4$	0.05 g
$MgSO_4$	0.02 g
$NaCl$	0.02 g
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	trazas
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	trazas
Agua	1.00 l

#### 4.3 PREPARACION DE LAS MUESTRAS DE FERMENTACION.

Con la masa se formaron bolas de aproximadamente 120 gramos, las cuales se cubrieron con plástico transparente --

con pequeñas perforaciones para dejar paso al aire y se colocaron en los envases de plástico tapados con su etiqueta de identificación.

Las muestras posteriormente fueron colocadas dentro del desecador, en el cual se introdujo además una placa insecticida para evitar la entrada de insectos ya que la fermentación los atraía.

Para el muestreo se tomaron 3 bolas escogidas en forma aleatoria de cada una de las fermentaciones. Los tiempos de muestreo fueron de 0 o 1 días (en excepciones), 3, 7, 9, 13 y 16 días.

Las condiciones de trabajo fueron las ambientales de tal manera que se registró una temperatura promedio de trabajo de 21° C.

#### 4.4 PREPARACION DE LA MUESTRA PARA SU ANALISIS.

La muestra se dividió en dos partes, de las cuales una se utilizó en forma natural para los análisis de vña húmeda, mientras que la otra porción se secó en un horno a 60° C sobre charolas de aluminio hasta peso constante.

La determinación de la humedad se hizo por diferencia de peso de la muestra según método 14.057 ADAC. (2)

La porción de muestra seca se molio en licuadora y después se tamizó a través de malla 20, según el método de preparación de muestra para cenizas 14.059 ADAC. (2)

#### 4.5 ANALISIS DE MUESTRAS.

##### 4.5.1 ANALISIS DE VIA HUMEDA.

Determinación de pH y Acidez por el método 14.063 ADAC. (2)

##### 4.5.2 ANALISIS DE MUESTRAS SECAS.

Humedad. Se determina con termobalanza.

Proteína. Por el método de Técnicas de análisis físico-químico para alimentos de S.S.A.

Cenizas. Método 14.059 ADAC.

Calcio. Método de Flaschka and Benard (19) con la modificación hecha por Watty (82).

Almidón. Método de técnicas de análisis físico-químico para alimentos de S.S.A. (64)

## V RESULTADOS.

Para cada muestra se obtuvieron en todos los tiempos de muestreo el pH y la acidez para observar su comportamiento durante el curso de la fermentación, y poder comparar más adelante el comportamiento de ambas fermentaciones (con inoculación del microorganismo o sin inoculación).

La humedad también se determinó en todo los tiempos de muestreo para observar si existía alguna pérdida importante de esta con respecto al tiempo.

El % de cenizas tan sólo se determinó en forma inicial y final para precisar la existencia de una pérdida de material.

El % de proteína se determinó en el caso de la fermentación sin inoculación en forma inicial y final ya que no se esperaba un incremento importante en la proteína. Por otra parte se realizó en la fermentación con inoculación la determinación en diferentes tiempos para observar el incremento de proteína con respecto al tiempo.

El % de almidón tan solo se determinó en forma inicial y final para observar si provenía de estos hidratos de carbono la producción de ácido o tan sólo de los azúcares libres.

Los mg/g de Ca se determinaron en forma inicial en ambas fermentaciones para comparar si éste era significativamente mayor en la fermentación con inoculación o no, por la presencia de lactato de calcio en el inóculo.

Los datos que se obtuvieron acerca de cada una de las muestras en las diferentes masas fermentadas, se presentan en los cuadros 9 y 10; divididos en grupos con respecto al tiempo, mientras que un resumen de las mismas se muestra en los cuadros 11 y 12, en donde se dan las medias de los datos (pH, % de humedad, % de acidez, en la primera) con respecto al tiempo, así como su desviación estandar, en forma comparativa para ambas fermentaciones, y la comparación de datos iniciales y finales de % de cenizas, % de almidón, % de proteína y mg/g de Ca. para ambas fermentaciones con su respectiva desviación estandar, en la segunda.

CUADRO NO. 9

TABLA INTEGRAL DE RESULTADOS FERMENTACION ESPONTANEA DE MASA

HUESTRA No.	TIEMPO DIAS	pH	% ACIDEZ B. Húmeda	% HUMEDAD	% CENIZAS B. Secca	% PROTEINA B. Secca	% ALMIDON B. Secca	Ca mg/g B. Secca
1	0	7.70	0.03	58.09	1.44	11.37	- o -	3.97
2	0	7.60	0.03	58.09	1.39	11.29	- o -	4.65
3	0	7.40	0.02	60.00	1.46	11.49	63.30	4.22
4	0	7.10	0.02	52/23	1/69	11/20	- o -	3/44
5	0	7.15	0.01	57.31	1.66	11.18	- o -	3.98
6	0	7.40	0.01	58.66	1.23	11.35	71.09	3.46
7	1	6.65	0.07	- o -	1.45	11.37	67.33	2.83
8	1	6.50	0.09	- o -	1.64	11.74	- o -	4.16
9	1	6.30	1.10	- o -	1.36	11.56	- o -	4.87
10	3	5.70	0.16	58.06				
11	3	5.70	0.17	57.72				
12	3	5.30	0.23	57.94				
13	3	5.50	0.21	57.16				
14	3	5.00	0.20	52.95				
15	3	5.25	0.19	50.90				
16	4	4.90	0.31	58.17				
17	4	4.90	0.30	59.21				
18	4	5.20	0.33	- o -				
19	7	4.05	0.00	55.84				
20	7	4.13	0.77	55.13				
21	7	3.95	1.02	54.73				
22	7	3.75	0.93	56.79				
23	7	3.75	=.93	55.32				
24	7	3.75	0.90	55.97				
25	7	4.10	0.88	59.75				
26	7	4.10	0.69	56.95				
27	7	4.20	0.91	54.95				
28	9	3.95	1.17	57.01				
29	9	3.95	1.18	59.34				
30	9	3.90	1.09	50.24				
31	9	3.50	1.13	56.58				
32	9	3.60	1.10	56.57				
33	9	3.70	1.10	54.72				
34	9	4.30	1.14	56.49				
35	9	4.40	1.05	56.55				
36	9	4.00	1.43	56.58				
37	13	3.90	1.10	56.91				
38	13	3.78	1.26	56.98				
39	13	3.80	1.25	57.00				
40	13	3.50	1.29	56.55				
41	13	3.50	1.27	53.97				
42	13	3.70	1.43	55.20				
43	13	3.00	1.37	58.40				
44	13	3.50	0.74	58.46				
45	13	3.70	1.56	57.62				
46	16	3.70	1.24	57.52				
47	16	3.90	1.28	57.26				
48	16	3.65	1.48	57.51				
49	16	3.40	1.47	56.54				
50	16	3.50	1.56	55.75				
51	16	3.40	1.47	55.06				
52	16	4.00	1.28	56.68				
53	16	3.85	1.21	57.43				
54	16	4.15	1.26	57.31				
55	20	4.45	0.80	59.72				
56	20	4.50	0.71	59.71				
57	20	3.70	1.27	57.87				
58	20	3.50	1.79	55.78				
59	20	3.40	1.31	55.94				
60	20	3.70	1.31	56.62				
61	20	4.25	1.19	56.39				
62	20	4.50	0.84	56.40				
63	20	4.82	0.68	56.06				
64	23	4.45	0.71	60.04	1.35	13.46	- o -	
65	23	3.90	1.03	58.03	1.45	12.68	61.98	
66	23	4.20	1.05	56.34	1.70	12.45	- o -	
67	23	4.20	0.90	56.05	1.30	12.46	- o -	
68	23	3.40	1.66	54.43	1.31	12.23	71.37	
69	23	3.50	2.03	55.60	1.68	12.41	- o -	
70	23	4.20	1.15	57.81	1.59	- o -	- o -	
71	23	4.35	1.14	57.66	1.69	- o -	- o -	
72	23	3.85	1.67	50.36	1.50	- o -	- o -	

CUADRO No. 10

TABLA INTEGRAL DE RESULTADOS FERMENTACION ESPONTANEA DE MASA INOCULADA CON A. AZOTOPHILUM.

MUESTRA No.	TIEMPO Dias	pH	% ACIDEZ B. Húmeda	% HÚMEDAD	% CENIZAS B. Seca	% PROTEINA B. Seca	% ALMIDON B. Seca	Ca mg/g B. Seca
1	0	7.40	0.02	58.64	1.65	11.66	58.78	4.79
2	0	7.10	0.02	57.43	1.40	11.95	- o -	4.37
3	0	7.00	0.02	58.20	1.52	10.90	- o -	4.45
4	0	6.90	0.02	55.04	1.68	11.45	- o -	4.17
5	0	6.80	0.03	57.82	1.35	10.95	- o -	3.22
6	0	7.00	0.03	55.45	1.43	11.68	64.76	3.57
7	0	7.00	0.03	56.61	1.46	- o -	- o -	3.23
8	0	7.00	0.02	58.10	1.50	11.65	69.20	3.25
9	0	6.90	0.02	57.61	1.59	11.55	- o -	3.41
10	3	5.55	0.18	57.61	1.52	11.42		
11	3	5.75	0.13	58.10	1.56	11.88		
12	3	5.50	0.14	58.51	1.63	11.38		
13	3	5.10	0.20	53.30	1.73	10.11		
14	3	5.40	0.16	49.71	1.72	12.17		
15	3	5.45	0.10	54.77	1.49	11.77		
16	3	5.45	0.14	47.70	1.55	10.80		
17	3	5.50	0.11	54.60	1.50	11.80		
18	3	5.35	0.16	56.19	1.46	11.85		
19	7	3.98	1.06	60.68	1.81	11.54		
20	7	4.05	0.97	56.42	1.99	11.43		
21	7	4.18	1.04	57.59	1.80	11.64		
22	7	3.95	0.88	56.48	1.66	12.12		
23	7	3.85	0.86	56.83	1.65	12.51		
24	7	3.90	0.88	56.97	1.45	12.40		
25	7	3.90	0.90	57.16	1.37	12.28		
26	7	4.10	0.86	56.67	1.72	12.11		
27	7	3.95	0.82	56.02	1.61	12.38		
28	9	4.10	0.94	58.85	1.74	12.07		
29	9	3.90	0.83	57.35	1.57	12.15		
30	9	3.95	1.19	57.91	1.71	11.98		
31	9	3.75	1.02	55.58	1.76	12.42		
32	9	3.75	0.99	56.40	1.77	12.46		
33	9	3.70	1.06	54.07	1.74	11.40		
34	9	3.60	0.94	52.36	1.51	12.17		
35	9	4.00	0.74	57.34	1.61	13.25		
36	9	3.80	1.03	56.41	1.75	13.02		
37	13	3.80	1.11	56.02	1.74	11.83		
38	13	3.80	1.24	57.31	1.76	12.21		
39	13	3.85	1.22	56.70	1.76	8.91		
40	13	3.60	1.38	54.55	1.77	11.98		
41	13	3.50	1.40	58.40	1.49	12.39		
42	13	3.60	1.08	55.37	1.54	12.05		
43	13	3.60	1.17	56.19	1.42	12.14		
44	13	3.55	1.37	56.04	1.63	12.21		
45	13	3.60	1.51	55.95	1.60	12.87		
46	16	3.90	1.49	58.07				
47	16	3.75	1.44	57.72				
48	16	4.00	1.07	58.92				
49	16	3.60	1.32	56.85				
50	16	3.65	1.37	56.08				
51	16	3.50	1.20	55.66				
52	16	3.50	1.39	56.86				
53	16	3.50	1.23	56.40				
54	16	3.60	1.20	55.95				
55	20	3.85	1.10	58.11				
56	20	4.15	1.05	58.41				
57	20	3.95	1.13	58.29				
58	20	3.50	1.34	55.30				
59	20	3.60	1.96	55.92				
60	20	3.50	1.66	56.97				
61	20	3.50	1.64	56.73				
62	20	3.60	1.28	55.99				
63	20	3.55	1.55	57.28				
64	23	4.15	1.07	57.89	1.77	13.53	- o -	
65	23	4.20	1.09	57.96	1.76	12.66	55.58	
66	23	4.00	1.17	57.95	1.66	12.87	- o -	
67	23	3.40	1.60	55.00	1.59	12.30	- o -	
68	23	3.40	1.42	54.14	1.74	12.42	- o -	
69	23	3.40	1.35	54.74	1.53	12.74	64.04	
70	23	3.50	1.87	54.92	1.66	12.45	- o -	
72	23	3.50	1.96	55.99	1.50	12.68	69.96	
72	23	3.55	1.61	54.90	1.54	12.18	- o -	

C U A D R O No. 11

CUADRO DE MEDIAS Y DESVIACION ESTANDAR PARA HUMEDAD, pH Y ACIDEZ EN LA FERMENTACION

TIEMPO	pH		% ACIDEZ		% HUMEDAD	
	SI <sup>a</sup>	I <sup>b</sup>	SI	I	SI	I
0	7.39 ± 0.24	7.01 ± 0.17	0.02 ± 0.01	0.023 ± 0.05	57.66 ± 2.90	57.21 ± 1.21
1	6.48 ± 0.18	- o -	0.09 ± 0.015	- o -	- o -	- o -
3	5.40 ± 0.20	5.45 ± 0.17	0.19 ± 0.03	0.15 ± 0.43	55.79 ± 3.08	54.50 ± 3.71
4	5.00 ± 0.17	- o -	0.31 ± 0.015	- o -	58.69 ± 0.74	- o -
7	3.90 ± 0.18	3.90 ± 0.11	0.89 ± 0.07	0.92 ± 0.08	56.16 ± 1.55	57.42 ± 1.44
9	3.92 ± 0.30	3.40 ± 0.16	1.15 ± 0.11	0.97 ± 0.13	56.91 ± 1.12	56.37 ± 1.84
13	3.69 ± 0.15	3.66 ± 0.13	1.25 ± 0.23	1.28 ± 0.15	56.87 ± 1.53	55.80 ± 0.81
16	3.34 ± 1.28	3.67 ± 0.18	1.34 ± 0.16	1.30 ± 0.14	56.89 ± 0.71	57.06 ± 0.91
20	4.09 ± 0.52	3.69 ± 0.24	1.10 ± 0.37	1.41 ± 0.31	57.14 ± 1.34	57.00 ± 1.11
23	4.01 ± 0.37	3.68 ± 0.34	1.26 ± 0.43	1.46 ± 0.33	57.07 ± 1.72	55.94 ± 1.51

<sup>a</sup> SI fermentación sin inoculación

<sup>b</sup> I fermentación con inoculación

C U A D R O No. 12

TABLA DE MEDIAS Y DESVIACION ESTANDAR PARA CENIZAS, CALCIO Y PROTEINA EN LA FERMENTACION

TIEMPO DIAS	% CENIZA		CALCIO		% AMILTON		% PROTEINA	
	B. Seca		mg/g B. Seca		U. Seca		B. Seca	
	SI <sup>a</sup>	I <sup>b</sup>	SI	I	SI	I	SI	I
0	1.48 ± 0.15	1.51 ± 0.11	3.83 ± 0.61	3.96 ± 0.62	67.55 ± 4.30	64.25 ± 5.23	11.39 ± 0.18	11.47 ± 0.37
23	1.51 ± 0.16	1.64 ± 0.10	- o -	- o -	66.68 ± 6.64	63.19 ± 7.23	12.62 ± 0.44	12.65 ± 0.40

a SI Fermentación sin inoculación

b I Fermentación con inoculación

## VI ANALISIS DE RESULTADOS.

El análisis estadístico de los datos que se obtuvieron de cada una de las muestras (esto es: % de acidez, pH, % de humedad y % de proteína) a lo largo de la fermentación, se realizó tratando de ajustar el comportamiento de cada uno de éstos contra el tiempo, a algún tipo de curva estadística. (8, 54) El resultado del análisis estadístico para ambas fermentaciones se muestra en el cuadro No. 13. En este cuadro aparecen además de el tipo de ajuste estadístico, los valores de la ordenada al origen (a), la pendiente (m), y la correlación (r), en el caso de haber tal ajuste. Cuando no existe correlación o ajuste estadístico, se dan los valores de la media (y) y de su desviación estandar (s).

Las gráficas 1 y 2 de las curvas de ajuste, se presentan en forma comparativa para las fermentaciones con inoculación y sin inoculación y en ellas se marcan además, los valores de las medias para pH o del % de acidez según sea el caso, dados en el cuadro No. 11.

Ya que el objetivo era observar el efecto en la cantidad de proteína en la fermentación con inoculación y sin inoculación del microorganismo *A. azotophilum*, se procedió a analizar los datos por medio de la t estadística para observar diferencias

C U A D R O No. 13

TABLAS DE CURVAS DE AJUSTE PARA LA FERMENTACION DE MASA  
INOCULADA Y NO INOCULADA CON A. AZOTOPHILUM

CURVA	TIPO DE AJUSTE	SIN INOCULACION	CON INOCULACION
% ACIDEZ vs TIEMPO	POTENCIAL $\ln a_c = \ln a + m \ln t$	$a = 0.11993$ $m = 0.83358$ $r = 0.9556$	$a = 0.12858$ $m = 0.81495$ $r = 0.96436$
PH vs TIEMPO	LOGARITMICA $pH = a + m \ln t$	$a = 5.82396$ $m = 0.7079$ $r = 0.91773$	$a = 5.57195$ $m = 0.66684$ $r = 0.95669$
% HUMEDAD vs TIEMPO	No hay correlación	No hay $y = 56.90$ $s = 1.76$	$y = 56.41$ $z = 1.96$
% PROTEINA vs TIEMPO	No hay correlación	- o - o - o -	$y = 11.97$ $s = 0.75$

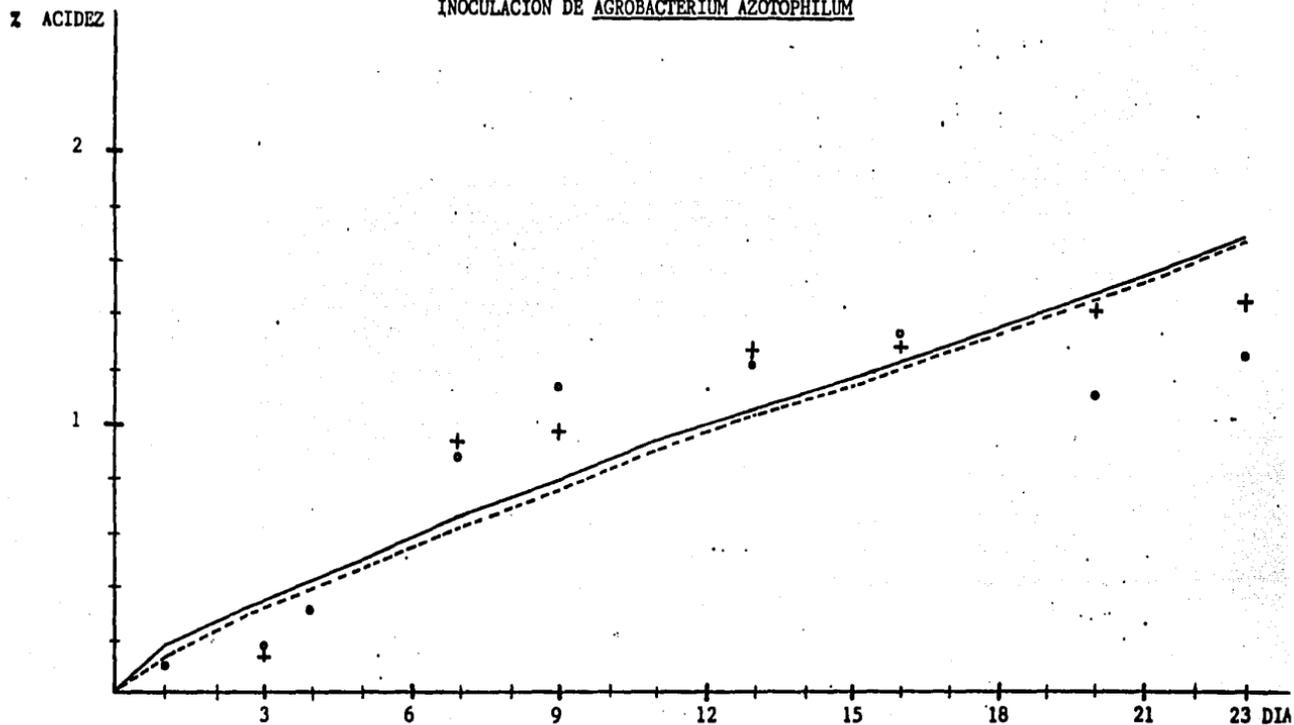
a= ordenada

m= pendiente

r= correlación

GRAFICA No. 1

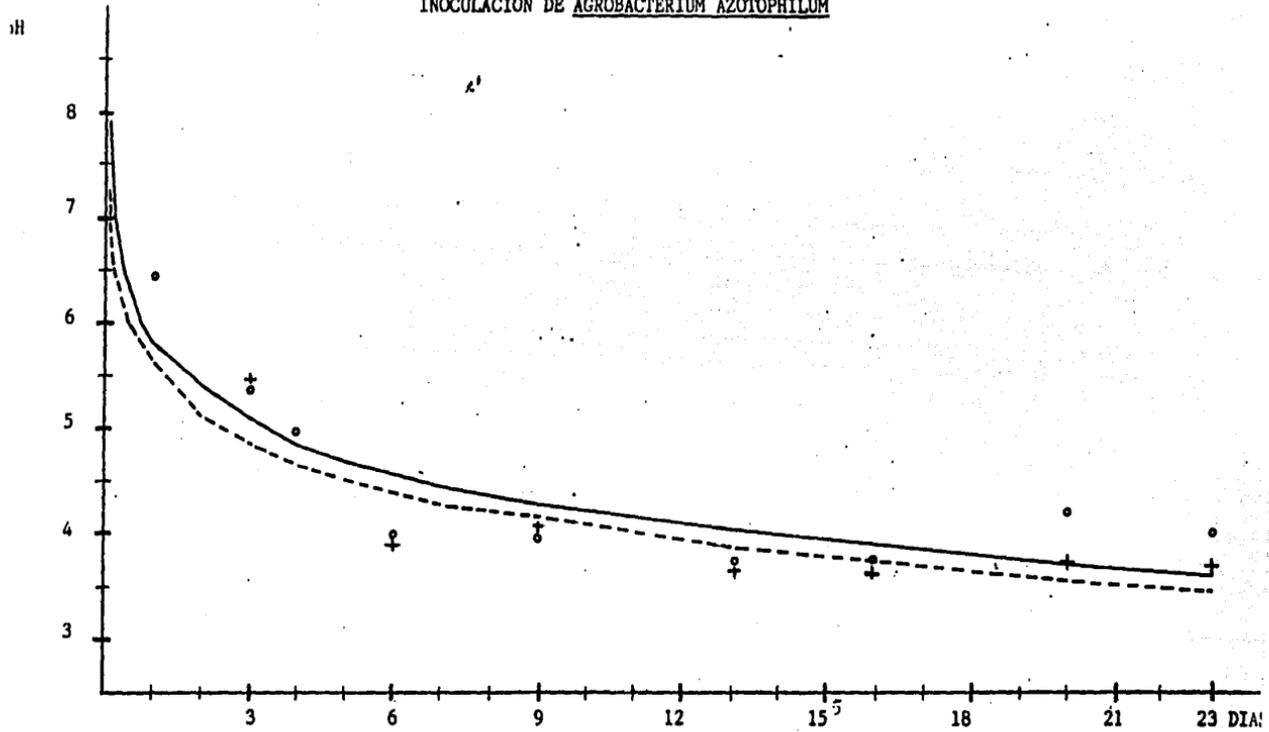
GRAFICA DE % ACIDEZ CONTRA TIEMPO EN DIAS PARA LA FERMENTACION DE MASA Y SIN  
INOCULACION DE AGROBACTERIUM AZOTOPHILUM



+ — Curva Potencial de Ajuste para la Fermentación con Inoculación,  
o --- Curva Potencial de Ajuste para la Fermentación sin Inoculación.

GRAFICA No. 2

GRAFICA DE pH CONTRA TIEMPO EN DIAS PARA LA FERMENTACION DE MASA CON Y SIN  
INOCULACION DE AGROBACTERIUM AZOTOPHILUM



- — Curva logarítmica de ajuste para la Fermentación con Inoculación  
o - - - Curva logarítmica de ajuste para la Fermentación sin Inoculación

significativas entre los grupos de datos tanto iniciales y finales de ésta, como en forma comparativa con la fermentación sin inoculación del microorganismo (B). Asimismo se probó la t estadística para todos aquellos datos que podrían influir en el comportamiento bioquímico de la fermentación. Los resultados de tal análisis, se muestran en el cuadro No. 14.

En cuanto al incremento proteínico fue de 10.00% para la fermentación sin inoculación y de 10.28% para la fermentación con inoculación del microorganismo. El incremento se determinó a partir de las medias aritméticas de cada una con la siguiente fórmula:

$$(Proteína\ final - Proteína\ inicial) \times 100$$

$$\% \text{ Aumento} = \frac{\text{-----}}{Proteína\ inicial}$$

C U A D R O No. 14

TABLA DE VALORES DE t ESTADISTICA PARA ALGUNOS ASPECTOS BROMATOLOGICOS DE LA FERMENTACION

COMPARACION DE:	VALOR DE t CALCULADO	VALOR DE t TABLAS AL 5%	GRADOS DE LIBERTAD	SE ESTABLECE QUE:
PROTEINA inicial y final sin inoc.	7.58	2.16	13	hay diferencia significativa
PROTEINA inicial y final con inoc.	6.29	2.13	15	hay diferencia significativa
PROTEINA INICIAL con inoc. y sin inoc.	0.58	2.13	15	no hay diferencia significativa
PROTEINA FINAL con inoc. y sin inoc.	0.15	2.16	13	no hay diferencia significativa
CENIZAS inicial y final no inoc.	0.369	2.12	16	no hay diferencia significativa
CENIZAS inicial y final inoc.	2.54	2.12	16	hay diferencia significativa
CENIZAS INICIAL inoc. y no inoc.	0.453	2.12	16	no hay diferencia significativa
CENIZAS FINAL inoc. y no inoc.	2.01	2.12	16	no hay diferencia significativa
ALMIDON inoc. inicial y final	0.175	3.18	3	no hay diferencia significativa
ALMIDON no inoc. inicial y final	0.204	2.78	4	no hay diferencia significativa
ALMIDON INICIAL inoc. y no inoc.	0.834	2.78	4	no hay diferencia significativa
ALMIDON FINAL inoc. y no inoc.	0.542	3.18	3	no hay diferencia significativa
CALCIO inoc. y no inoc.	0.445	2.12	16	no hay diferencia significativa

## VII CONCLUSIONES

De acuerdo al análisis de datos, aunque existe un incremento en la proteína, éste es de la misma magnitud para ambas fermentaciones, lo cual indica que el microorganismo *A. azotophilum* en las condiciones dadas para el experimento no fijó nitrógeno atmosférico.

Lo anterior se puede deber a que la temperatura promedio fue menor que la temperatura óptima para la fijación de nitrógeno del microorganismo.

En cuanto al comportamiento bioquímico, se ve que es el mismo para ambas fermentaciones, ya que siguen un mismo comportamiento estadístico como se puede observar claramente en las gráficas, a pesar de la inoculación del microorganismo.

Como se presentó una ligera pérdida de agua en las muestras al principio de la fermentación, se puede considerar que la humedad inicial de 61% fue elevada.

En cuanto al análisis de calcio que se realizó para observar el efecto de la inoculación, con medio de lactato de calcio 77 F.W., no se observa que exista diferencia significativa entre ambas fermentaciones y por tanto no afecta el comporta---

miento de la fermentación en cuanto al incremento de acidez y la disminución del pH.

No se observó variación, de una fermentación a otra, en el % de almidón, además de que se mantiene constante, por lo que, se considera que no es hidrolizado por ningún microorganismo presente y por tanto la acidez que se presenta es debida a la fermentación de los azúcares libres.

## VIII RECOMENDACIONES

Para continuar este trabajo se sugiere reducir, en primer lugar la humedad de la muestra de 61% a 35%, que es la humedad determinada por los investigadores Ulloa y Taboada (75) en sus trabajos sobre el pozol. Además se sugiere reducir el tiempo de estudio a 8 días y realizar un muestreo diario, ya que la mayor proporción de cambio en acidez y pH se verifica en este tiempo.

En cuanto a las condiciones de trabajo en el laboratorio se sugiere mantener las muestras a una temperatura de 26° C que es la óptima del microorganismo (67, 72), para que se pueda apreciar si hay o no fijación de nitrógeno por el microorganismo A. azotophilum.

En cuanto al medio de cultivo para el inóculo, se sugiere cambiar la fuente de carbono por algún azúcar que utilice el microorganismo como la glucosa, la sacarosa o la xilosa, para evitar la precipitación que se presenta con el lactato de calcio.

En futuras investigaciones, se sugiere utilizar algún microorganismo que hidrolice almidón, para que los azúcares resultantes puedan utilizarse para el crecimiento del microorganismo A. azotophilum y por lo tanto en la producción de protefina.

## IX APENDICES

### 9.1 BIBLIOGRAFIA.

1. Andah A. and Muller H. G. Studies on Koko a Ghanaian Fermented Maize Porridge. Ghana Int. Agric. Sci 6, 103 - 108, (1973).
2. AOAC (Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist). Horwitz, W. editor. 11a. Edición. Washington, D.C., (1970).
3. Au P. M. and M. L. Fields. Nutritive Quality of Fermented Sorghum. A Research Note. J. Food Sci.
4. Akingbala J. O, Rooney L. W. y Faubion J. M. A Laboratory Procedure for the Preparation of Ogi, a Nigerian Fermented Food. J. Food Sci 46, 1523 - 1526, (1981).
5. Band A. and Muller H. G. Studies of Kenkey with particular reference to Calcium and Phytic Acid. Cereal. Chemistry 53 [3], 365 - 375, (1976).
6. Banigo E.O.I. and Muller H.G. Carboxylic Acid Patterns

- in Ogi Fermentation. J. Sci. Fd. Agric. 23, 101 - 111, (1972).
7. Banigo E.O.I. and Muller H.G. Manufacture of Ogi (a Nigerian Fermented Cereal Porridge): Comparative Evaluation of Corn, Sorghum and Millet. Can. Inst. Food Sci Technol. J. 5, [4], 717 - 721, (1972).
  8. Bowker A. H. and Lieberman G. J. Estadística para Ingenieros. Prentice Hall Internacional. Colombia, (1981).
  9. Brock T. D. Biology of microorganisms. Prentice Hall Inc Second Edition. New Jersey, U.S.A., (1974).
  10. Cardenas Q. S. y Buckle T. S. Sour Cassava Starch Production: A Preliminary Study. J. Food Sci. 45, 1509, (1980)
  11. CIAT Informe 1981. Cali Colombia. Recuento de las principales actividades en 1980, 124p.
  12. Collins J. L. and C. R. Temalilwa. Cassava (Manihotesculenta Crantz) Flour Fortification with Soy Flour. J. Food Sci. 46, 1025 - 1028, (1981).
  13. Cravioto R. O., D. Y. Cravioto, G. Massieu H., J. Guzmán C. "El pozol" forma indígena de consumir el maíz en el sureste de México y su aporte de nutrientes a la dieta.

- Ciencia, Mex. 15, 27 - 30, (1955).
14. Cruz Ulloa y Miguel Ulloa. Alimentos Fermentados de Maíz Consumidos en México y otros Países Latinoamericanos Rev. de la Soc. Mex. de Hist. Nat. XXXIV 423 - 457, (1973).
  15. Datta Rathin. Acidogenic Fermentation of Corn Stover. Biotechnology and Bioengineering, XXXIII, 61 - 77, (1981)
  16. Davis, Dulbecco, Eisen, Ginsberg, Wood, Mc. Carty. Microbiology, Second Edition. Harper International Edition U. S.A., (1973).
  17. Desrosier N. W. and Desrosier J. N. The Technology of - Food Preservation. 4th. edition, AVI Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut, (1977).
  18. Durán P. Aprovechamiento de nejayote de nixtamal por métodos microbiológicos. Tesis de licenciatura de Q.F.B. México, D.F., (1981).
  19. Fennema O. R. Food Chemistry. Merce! Dekker. New York U.S.A., (1976).
  20. Fields M.L. Hamad A. M. and Smith D. K. Natural Lactic Acid Fermentation of Corn Meal. J. Food Sci. 46, 900 - 902 (1981).

21. Flaschka y Barnard. Química Analítica Cuantitativa. Ed. Continental, S.A., México, (1973).
22. Fuentes I. Herrera T. y Ulloa M. Descripción de una especie nueva de Pseudomonas, P. mexicana y determinación de Escherichia coli var. neapolitana aisladas del pozol. Rev lat-amer. Microbiol. 16: 99 - 103, (1974).
23. Fuente de la J. Yalag una Villa Zapoteca Serrana., Museo Nacional de Antropología. Serie Científica II Cap. IV Alimentación. México, D.F., (1949).
24. Geervani P. y F. Theophilus. Influence of Legume Starches and Protein Utilization and Availability of Lysine and Methionine to Albino Rats. J. Food Sci. 46, 817-818, (1981)
25. Goering T. J. Los Tubérculos Potencial Alimentario y Energético. Finanzas y Desarrollo. 32 - 35, (Jun 1980).
26. Gómez G. J. and Viniegra-González. Orientation of Sugar Fermentation Inoculated with Heterogeneous Microbial Population. Trabajo presentado en el VI Simposium Internacional de Fermentaciones. Londres Ontario, (1980)
27. Hamad Ahmed M. y M. L. Fields. Evaluation of the Protein Quality and Available Lysine of Germinated and Fermented Cereals, J. Food Sci. 44, [2], 456 - 459, (1979).

28. Hardin Clifford M. Impact of Plant Proteins in Worldwide Food Systems. Food tech. 33, 69 - 71, (Junio - 1979).
29. Henry N.G. Factors Affecting Organic Acid Production by Sourdough. (Sn. Francisco) Bacteria. Appl. Microbiol. 23, [6], 1153 - 1159, (1979).
30. Herrera T. y Ulloa M. Aspectos Generales sobre la Microbiología del Pozol. Rev. lat-amer. Microbiol. 12, 103 - 108, (1970).
31. Herrera T. y Ulloa M. Estudio sobre Inhibidores de la Fijación de Nitrógeno en Agrobacterium azotophilum. An. - Inst. Biol. Univ. Nal. Auton. México. 42, Ser. Biol. Exp. (1) 23 - 30, (1971).
32. Herrera T. y Ulloa M. Estudio de Candida krusei y Trichosporon cutaneum aislados del pozol. Rev. lat-amer. Microbiol. 13, 255 - 261, (1971).
33. Herrera T., Taboada J. y Ulloa M. Fijación de Nitrógeno en el Tesguino y el Pulque. An. Inst. Biol. Univ. Auton. México, 43 Ser. Bot. (1), 77 - 78, (1972).
34. Herrera T. y Ulloa M. Estudio de Hansenula fabianii aislada del pozol. An. Inst. Biol. Univ. Nal. Auton. México 44 Ser. Bot. (1), 1 - 8, (1973).

35. Herrera T. y Ulloa M. Antagonismo del pozol y de Agrobacterium azotophilum sobre diversas especies de bacterias y hongos, algunos patógenos del hombre. Rev. lat-amer. Microbiol. 17, 143 - 147, (1975).
36. Herrera T. y Ulloa M. Reconsideraciones sobre dos trabajos anteriores, para la identificación de Kluyveromyces fragilis y Candida guilliermondii en el Pozol, y de Kloeckera apiculata en el Pulque. Bol. Soc. Mex. Mic. 2, 13-15, (1975).
37. Katz S. H., Hedeger M. L., Valleroy L. A. Traditional Maize Processing Techniques in the New - World. Traditional alkali processing enhances the Nutritional Quality of Maize, Science 184, 765 - 773, (1974).
38. Kazanas N. and M. L. Fields Nutritional Improvement of Sorghum by Fermentation, J. Food Sci. 46, 819 - 821, (1981).
39. Lay Maggie May-Gi y M. L. Fields. Nutritive Value of Germinated Corn and Corn Fermented after Germination, J. Food Sci. 46, 1069 - 1073, (1981).
40. Lehninger A. L. Biochemistry. Second Edition. Worth, Publishers Inc. New York. U.S.A., (1975).

41. Line M. A. and Loutit M. W. Nitrogen-Fixation by Mixed Cultures of Aerobic and Anaerobic Microorganisms in Aerobic Enviroment. General Microbiol. 74, 179 - 180, (1973)
42. Lomelí Arturo. La Desnutrición, el Principal Problema de Salud en el País. Novedades, segunda sección, Pag. 1 y 6 Novedades Editores No. 15,535., ano XLVIII, 2-IV-1984.
43. Martínez-Herrera M. L. y P. A. Lachance. Corn (Zeamays) Kernel Hardness as an Index of the Alkaline Cooking Time for Tortilla Preparation. J. Food Sci 44, [2], 377 - 380 (1980).
44. Massieu. H. G., Cravioto R. O., Guzmán G. J., Olivera B. H. Contribución Adicional al Estudio de la Composición de Alimentos Mexicanos. Ciencia XIX, [4 - 5], 53 - 65, (1959).
45. Muller H. G. and Lynd B. N-M. "Kenkey". Arkady Review, 48, 32, (1971).
46. Muller H. G. Fermented Cereal Products of Tropical Africa. VI Simposium Internacional de Fermentaciones. Londres - Ontario, (1980).
47. Muñoz D., Viniegra-González G. Improved Nitrogen Fixation by Mixed Cultures of Lactic Acid Bacteria and Azotobacter

chroococcum. Depto. Biotecnol. Univ. Auton. Metropolitana-  
na Iztapalapa, (1982).

48. Nout M.J.R. The Role of Lactic Acid Fermentations in the Context of Food Manufacture In Kenya. Rhizosphere. Biology, Global Impacts of Applied Microbiology. Sixth International Conference. Academic Press. 169 - 175, (1981).
49. Okafor Nduka. A Scheme for the Improvement of Fermented Foods of Africa. South of Sahara., Microbiology of Food and Agriculture, 61 - 69, (1981).  
Global Impacts of Applied Microbiology. Sixth International Conference, (1980).
50. Pederson Carl S. Microbiology of Food Fermentations 2nd. edition. AVI Publishing Co. Inc. Connecticut U.S.A., -- (1979).
51. Pido P. P., Adeyanju S. A. y Adegbala A. A. The Effect - of Graded Levels of Fermented Cassava Meal on Broilers., Poultry Sci. 58, 427 - 431, (1979).
52. Preston T. R. Central America: Grow Bananas Instead of Maize., Bioconversion, Key to Unlocking vast new energy nutrient sources. Work in progress. Supplement to the ONU Newsletter. 4, (2), (Jul 1980). The United Nations, Japan.

53. Raimbault M. Conferencia: "Las Fermentaciones Sólidas". Enero 1982, Depto. de Alimentos. Facultad de Química de la U.N.A.M.
54. Rascon O. A. Introducción a la estadística descriptiva. Vol I, Segunda edición. U.N.A.M. Dirección General de Publicaciones México, (1974).
55. Reddy N. R. y D. K. Salunkhe. Effects of Fermentation on Phytate Phosphorus and Mineral Content in Black Gram, -- Rice and Black Gram and Rice Blends. J. Food Sci. 45, -- 1708 - 1712, (1980).
56. Reed G. Enzymes in Food Processing. 2nd. edition. Academic Press, Inc. New York, (1975).
57. Samuel W. A. and Y. Y. Lec. Lactic Acid Fermentation of Crude Sorghum. Extract. Biotechnology and Bioengineering XXII, 757 - 777, (1980).
58. Sánchez Mejorada M. D. Cambios en las Proteínas del Maíz Durante la Nixtamalización. Tesis de Maestría. Octubre de 1982.
59. Sathe S. K. y Salunkhe D. K. Fermentation of the Great Northern Bean (Phaseolus vulgaris L.) and Rice Blends. J. Food.Sci. 46, 1374 - 1378 y 1393, (1981)

60. Senéz J. C. Solid State Fermentation of Starchy Substrates. Bioconversion of Organic Residues for Rural Communities 127 - 131. Papers presented at the Conference of -- the State of the Art of Bioconversion of Organic Residues for Rural Communities. Institute of Nutrition of Central America and Panama. Guatemala, Nov. 1978. The United Nations University.
61. Senéz J. C. Protein Enrichment by Simplified Technology Bioconversion: Key to unlocking vast new energy nutrient sources. Work in Progress. Supplement to the ONU Newsletter. 4, [2], (Jul 1980), The United Nations University Japan.
62. Smith B. E. Nitrogen Fixation by Free-living Microorganisms., Process Biochemistry, 12, 21 - 26, (Sept 1977).
63. Srinivasan V. R. Production of Single-cell Protein from Cellulose, 132 - 138, Papers presented at the Conference of the State of the Art of Bioconversion of Organic Residues for Rural Communities. Institute of Nutrition of -- Central America and Panama. Guatemala, Nov. 1978. The United Nations University.
64. S.S.A. Técnicas de Análisis Físicoquímico para Alimentos. México.

65. Taboada J., Herrera T. y Ulloa M. Prueba de la Reducción del Acetileno para la Determinación de Microorganismos Fijadores de Nitrógeno Aislados del Pozol. Rev. lat-amer. Quim. 2, 188 - 191, (1972).
66. Taboada J. y Herrera T. Efecto de Aminoácidos sobre la Fijación de Nitrógeno por Agrobacterium azotophilum., An. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. México 43, Ser. Bot. Exp. - (1), 35 - 42, (1973).
67. Taboada J., Ulloa M. y Herrera T. Fijación de Nitrógeno *in vitro* por Agrobacterium azotophilum en diversos substratos, principalmente tierra y derivados de la industria azucarera, Rev. lat-amer. Microbiol. 15, 143 - 146 (1973)
68. Taboada J., Salinas C., Ulloa M. y Herrera T. Fijación de Nitrógeno en Cultivos Monoespecíficos y Mixtos de Aerobacter aerogenes y Agrobacterium azotophilum usando distintas fuentes de carbono., Rev. lat-amer. Microbio. 17, 157 - 159, (1975).
69. Tongnual Penkwan, N. J. Nanson and M. L. Fields. Effect of Proteolytic Bacteria in the Natural Fermentation of Corn to Increase its Nutritive Value., J. Food Sci. 46, - 100 - 104 y 109, (1981).

70. Ulloa M., Herrera T. y de la Lanza G. Fijación de Nitrógeno Atmosférico por Microorganismos del Pozol. Rev. lat-amer. Microbiol. 13, 113 - 124, (1971).
71. Ulloa M. y Herrera T. Mohos aislados del Pozol en Medios con Deficiencia o Carencia de Nitrógeno., Bol. Soc. Mex. Mic. 5, 13 - 21, (1971).
72. Ulloa M. y Herrera T. Descripción de dos especies nuevas de bacterias aisladas del pozol: Agrobacterium azotophilum y Achromobacter pozolis., Rev. lat-amer. Microbiol. 14, 15 - 24, (1972).
73. Ulloa M. y Herrera T. Características generales y algunos datos sobre pruebas de cinco especies de Penicillium aisladas del pozol., Rev. lat-amer Microbiol. 15, 191 - 197, (1973).
74. Ulloa M. y Herrera T. Phealophora richardsiae, un hongo causante de feosporotricosis en el hombre, aislado del pozol., Rev. lat-amer Microbiol. 15, 199 - 201, (1973).
75. Ulloa M. Mycofloral succession on pozol from Tabasco México. Bol. Soc. Mex. Mic. 8 Dic., (1974).
76. Ulloa M. y Kurtzman C. P. Occurrence of Candida para psilosis, C. tropicalis and Saccharomyces cerevisiae in Po--

- zol from Tabasco, México., Bol. Soc. Mex. Mic. 9, 7 - 12, (1975).
77. Ulloa M. Indigenous Fermented Beverages of Mexico. Global Impacts of Applied Microbiology. Sixth International Conference (GIAM VI Lagos, 1980). Academic Press 45 - 59, (1981).
78. Umoh V. I. y Fields M. Fermentation of Corn for Nigerian Agidi. J. Food Sci. 46, 903 - 905, (1981).
79. Van der Wal P. "95% of World's Land has Untapped Nutrient Source" Bioconversion Key to Unlocking Vast New Energy - Nutrient Sources. Work in Progress. Supplement to the - ONU Newsletter. 4, [2], (Jul. 1980), The United Nations - University, Japan.
80. Wang H. L. and Hesseltine C. W. Use of Microbial Cultures. Legume and Cereal Products., Food Tech. 35, 79 - 83, (Jan. 1981).
81. Wang D. I. C., Cooney C. L., Demain A. L., Dunnill P Humphrey A. E., Lilly M. Fermentation & Enzyme Technology John Wiley & Sons Inc., (1979).
82. Watty M. Modificación a la Técnica de Determinación de Calcio por Titulación con EDTA. Maestra de tiempo comple

to en la Facultad de Química de la UIA. Comunicación personal.

83. Wolf W. J. Proteínas Comestibles de la Soya y sus Usos. ASA/México MN No. 5. Trabajo presentado en el Seminario sobre Suplementación con Proteína de Soya, Jamaica "Bureau of Standards" Kingston, Jamaica., Sept. 29 - 30, 1977.
84. Zamora A. and Fields M. L. Production of Corn and Legume Malts for use in Home Fermentation. J. Food Sci. 43, 205 - 207, 214, (1978).
85. Zubirán S., Chávez A., Bonfil G., Aguirre G., Cravioto J. y de la Vega J. La Desnutrición del Mexicano. Fondo de Cultura Económica México, D. F., (1974).

## 9.2 ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA.

### 9.2.1 INSTITUCIONES.

FAO	Organización para la Alimentación y la Agricultura.
WHO	Organización Mundial de la Salud.

### 9.2.2 UNIDADES

#### a) Estadísticas.

a	Ordenada al origen
m	Pendiente
P	Probabilidad
r	Correlación
s	Desviación estandar
t	Medida de la dispersión de datos.

#### b) Métricas y otras.

atm	Atmósferas
cm	Centímetros

°C	Grado centígrado
g	Gramo
Kcal	Kilocalorías
Kg	Kilogramo
l	Litro
$\lambda$	Longitud de onda
ln	Logaritmo natural
$\mu$ g	Microgramo
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mM	Milimol
p/p	Peso en peso
p/v	Peso en volumen
%	Porcentaje
t	Tiempo
T	Temperatura
v/v	Volumen en volumen

### 9.2.3. QUIMICAS Y BIOQUIMICAS.

ADP	Adenosin difosfato
ATP	Adenosin trifosfato
Ca	Calcio
Ca(OH) <sub>2</sub>	Hidróxido de calcio
CHECH	Acetileno

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

$\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$	Acido láctico
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	Alcohol etílico
$\text{HC}\equiv\text{N}$	Cianuro
$\text{CH}_2=\text{CH}_2$	Etileno
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	Hexosa (azúcar)
$\text{CO}_2$	Bioxido de carbono
D	Dextrógiro
L	Levógiro
DL	Mezcla de ambos (racemica)
$e^-$	Electrones
FMN	Flavín mononucleótido
Fe	Hierro
$\text{H}^+$	Ion Hidrógeno
$K_M$	Constante de Michaelis - Menten
Mg	Magnesio
Mo	Molibdeno
NAD	Nicotín amida difosfato
NADH	Nicotín amida difosfato reducido
$\text{NH}_3$	Amoniaco
$\text{NH}_2$	Grupo amino
$\text{HN}\equiv\text{N}$	Grupo azo
$\text{N}_2$	Nitrógeno
$\text{NO}_3^-$	Nitrato
$\text{NO}_2^-$	Nitrito
$\text{N}_2\text{O}_3$	Oxido Nitroso
Pi	Fósforo inorgánico
P.M.	Peso molecular

pH	Potencial hidrógeno
PER	Relación de eficiencia proteínica
% RNV	Porcentaje de valor nutritivo relativo.